

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO  
AQUOSO DE *Peumus boldus* (BOLDO) FRENTE À TOXICIDADE  
INDUZIDA POR FERRO E COBRE EM DIFERENTES MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Cláudia Vargas Klimaczewski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2018**

**Cláudia Vargas Klimaczewski**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Peumus boldus* (BOLDO) FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA POR FERRO E  
COBRE EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador João Batista Teixeira da Rocha  
Co-orientadora Nilda Vargas Barbosa**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2018**

Klimaczewski, Cláudia

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Peumus boldus* (BOLDO) FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA POR FERRO E COBRE EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS / Cláudia Klimaczewski.- 2018.

78 p.; 30 cm

Orientador: João Batista Teixeira da Rocha

Coorientadora: Nilda Vargas Barbosa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2018

1. *Peumus boldus* 2. Estresse Oxidativo 3. Ferro 4. Cobre 5. *Drosophila melanogaster* I. Teixeira da Rocha, João Batista II. Vargas Barbosa, Nilda III. Título.

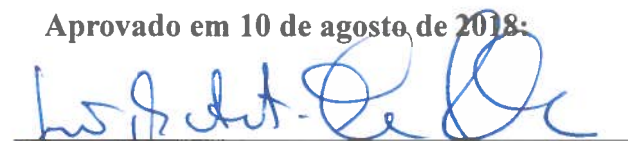
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Cláudia Vargas Klimaczewski

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Peumus boldus* (BOLDO) FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA POR FERRO E  
COBRE EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Bioquímica Toxicológica.**

**Aprovado em 10 de agosto de 2018:**

  
\_\_\_\_\_  
**João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Nilda Vargas Barbosa, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Co-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Thais Posser, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Elgion Loreto, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Cristiane Lenz Dalla Corte, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Robson Puntel, Dr. (UNIPAMPA) - Parecer**

Santa Maria, RS

2018

“Como foi que os povos pré-modernos descobriram que um chá feito com essa árvore em particular, dentre todas as plantas da floresta, aliviaria os sintomas da malária? Devem ter experimentado toda árvore (...). Isso constitui um sólido conjunto de experimentos científicos continuados ao longo de gerações(...). Deveríamos estar fazendo esforços muito maiores para explorar os tesouros desse conhecimento popular em todo o mundo “.

Carl Sagan

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores, Prof. João Batista Teixeira da Rocha e Prof<sup>a</sup> Nilda Vargas Barbosa, pela ajuda, paciência, confiança e ensinamentos. A todos os meus colegas e amigos do laboratório os quais me ajudaram na realização deste trabalho. A minha família pelo amor, apoio e incentivo. Aos recursos financeiros concedidos pela CAPES, CNPQ e FAPERGS. Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela possibilidade da realização deste doutoramento.

## RESUMO

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Peumus boldus* (BOLDO) FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA POR FERRO E COBRE EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS

AUTORA: Cláudia Vargas Klimaczewski  
ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha  
CO-ORIENTADOR (A): Nilda Vargas Barbosa

Os metais de transição ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) são elementos vitais devido as suas propriedades de oxido-redução. Porém, o acúmulo de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  na forma livre pode causar estresse oxidativo (EO), por serem catalisadores da reação de Fenton. Esta condição pode levar a danos em macromoléculas biológicas e está envolvida na etiologia de várias patologias, principalmente a nível hepático e neurológico, onde  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  se acumulam. Logo, existe um interesse crescente na busca de agentes que possam minimizar ou bloquear os efeitos tóxicos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . O extrato bruto de *Peumus boldus*, utilizado para o tratamento de desordens hepáticas, possui propriedades antioxidantes que já foram evidenciadas em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, assim como a boldina, principal alcaloide isolado da planta. No entanto, os possíveis efeitos farmacológicos de *P. boldus* sobre a hepatotoxicidade induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , bem como a possível ação protetora contra a toxicidade induzida por  $\text{Cu}^{2+}$ , ainda não foram explorados. Da mesma forma, ainda não há pesquisas com *P. boldus* e toxicidade induzida por  $\text{Cu}^{2+}$  usando a *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. Além das vantagens em termos de custo e manutenção, *D. melanogaster* é uma espécie bastante confiável para estudos toxicológicos, uma vez que possui genes relacionados com a homeostase de  $\text{Cu}^{2+}$  que são altamente conservados em mamíferos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito protetor de *P. boldus* e boldina contra o dano oxidativo hepático induzido por  $\text{Fe}^{2+}$ , utilizando mitocôndrias de fígado de rato *in vitro*. Além disso, os efeitos oriundos da suplementação com *P. boldus* sobre alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  em *D. melanogaster* também foram testadas. De forma geral, verificamos que *P. boldus* foi mais eficiente que a boldina em diminuir a peroxidação lipídica, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o inchaço causado por  $\text{Fe}^{2+}$  em mitocôndrias hepáticas. Os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante em sistemas não biológicos mostraram que *P. boldus* foi eficaz em quelar  $\text{Fe}^{2+}$ , enquanto que boldina exibiu maior poder redutor. As moscas expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$  apresentaram uma redução no desempenho locomotor, observado através do teste de escalada, que foi melhorado pelo tratamento com *P. boldus*. A exposição ao  $\text{Cu}^{2+}$  diminuiu a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e glutathione-S-transferase (GST), que foram revertidas aos níveis do controle pelo tratamento com *P. boldus*. O  $\text{Cu}^{2+}$  causou um aumento na expressão de mRNA das enzimas superóxido dismutase (Sod1), catalase (Cat), tioredoxina redutase (TrxR1), fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), acetilcolinesterase (Ace) e dos transportadores de  $\text{Cu}^{2+}$ , ATPase do tipo P (Atp7A) e proteína de absorção de cobre 1 (Ctr1A). As alterações observadas na expressão do mRNA foram protegidas pelo tratamento com *P. boldus*. Em conjunto, os dados obtidos mostram que *P. boldus* é uma planta promissora para modular a toxicidade de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , e que o extrato de *P. boldus* e boldina isolada têm propriedades antioxidantes, que podem atuar em doenças hepáticas associadas ao  $\text{Fe}^{2+}$  livre e ao EO. Esses resultados contribuem para o avanço das pesquisas na área de toxicologia e farmacologia de produtos naturais, bem como para a triagem de agentes terapêuticos promissores para tratar intoxicações ou doenças autossômicas associadas com o acúmulo de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Palavras-chave:** *P. boldus*, boldina, reação de Fenton, estresse oxidativo, ferro, cobre, mitocôndrias, *Drosophila melanogaster*, defesa antioxidante.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THERAPEUTIC POTENTIAL OF *Peumus boldus* (BOLDO) AQUEOUS EXTRACT AGAINST TOXICITY INDUCED BY IRON AND COPPER IN DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS

AUTHOR: Cláudia Vargas Klimaczewski

ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

CO-ADVISOR: Nilda Vargas Barbosa

The transition metals iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) and copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) are vital trace elements due to oxi-reducing properties. However, the free  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  accumulation can lead to oxidative stress (OS), by catalysis the Fenton reaction. The OS can lead to damage in biological macromolecules and is involved in the etiology of various pathologies, especially in liver and central nervous system (CNS), where  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  accumulates. Therefore, there is a growing interest for agents able to minimize or block the toxic effects of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . The *Peumus boldus* extract, used for the treatment of liver disorders, has shown antioxidant properties in different *in vivo* and *in vitro* experimental models, as well as boldine, the main alkaloid isolated from the plant. However, the pharmacological properties of *P. boldus* against  $\text{Fe}^{2+}$ -induced hepatotoxicity, and  $\text{Cu}^{2+}$ -induced toxicity, remains unexplored. Likewise, there is no data on the possible beneficial effects of *P. boldus* on the  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity using *Drosophila melanogaster* as an experimental model, a specie widely used due to the fact of sharing well conserved genes with mammals such as those related to  $\text{Cu}^{2+}$  homeostasis. Thus, the main objective of this study was to evaluate the possible protective effect of *P. boldus* and boldine against  $\text{Fe}^{2+}$ -induced hepatic oxidative damage *in vitro* using rat liver mitochondria, and the effect of *P. boldus* supplementation on molecular alterations induced by exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  in *D. melanogaster*, *in vivo* and *ex vivo*. The results show that *P. boldus* aqueous extract was more efficient than boldine in decreasing the lipid peroxidation, the reactive oxygen species (ROS) production, and swelling induced by  $\text{Fe}^{2+}$  in hepatic mitochondria of rats. The antioxidant activity assays in non-biological systems showed that *P. boldus* was effective in chelating  $\text{Fe}^{2+}$ , whereas boldine presented higher reducing power than *P. boldus*.  $\text{Cu}^{2+}$  impaired in the negative geotaxis performance (i.e. motor climbing capability), but *P. boldus* co-exposure was effective to protect against the  $\text{Cu}^{2+}$ -induced toxicity. Acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activity decreased significantly in *D. melanogaster* after  $\text{Cu}^{2+}$  exposure. *P. boldus* co-treatment restored enzyme activities to control levels. In addition,  $\text{Cu}^{2+}$  exposure increased the mRNA levels of the enzymes, superoxide dismutase (Sod1), catalase (Cat), thioredoxin reductase (TrxR1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), acetylcholinesterase (Ace) and  $\text{Cu}^{2+}$  transporters, P-type ATPase (Atp7A) and copper uptake protein 1 (Ctr1A). These alterations were restored to control levels by co-treatment with *P. boldus*. These findings suggest that *P. boldus* could be considered a promising plant in modulation of toxicity induced by an excess of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . *P. boldus* and boldine can have antioxidant properties in protection against hepatic diseases associated with Fe-free and OS. In summary, these results contribute to the advancement of the investigations of agents that may in the assist therapy of intoxications or autosomal diseases linked to an excess of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Keywords:** *P. boldus*, boldine, Fenton reaction, oxidative stress, iron, copper, mitochondria, *Drosophila melanogaster*, antioxidant defenses.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção de Fe <sup>2+</sup> da dieta.....	15
Figura 2 - Fe <sup>2+</sup> mitocondrial.....	18
Figura 3 - Transportadores do Cu <sup>2+</sup> da família Ctr.....	22
Figura 4 - Esquema do transporte e distribuição celular do Cu <sup>2+</sup> .....	23
Figura 5 - Formação de ligações dissulfeto .....	26
Figura 6 – Planta <i>Peumus boldus</i> .....	33
Figura 7 - Estrutura molecular do alcaloide boldina.....	34
Figura 8 - Esquema do transporte celular de Cu <sup>2+</sup> em mamíferos e <i>Drosophila</i> .....	36

### ARTIGO 1

Esquema 1 – Protective effect of <i>Peumus boldus</i> extract (PbE) against Fe <sup>2+</sup> -induced mitochondria oxidative stress.....	41
Figura 1 – Effects of <i>P. boldus</i> and boldine on Fe <sup>2+</sup> -induced mitochondrial membrane lipid peroxidation.....	42
Figura 2 – Effects of <i>P. boldus</i> and boldine on Fe <sup>2+</sup> -induced mitochondrial swelling.....	43
Figura 3 – DPPH• scavenging activity by <i>P. boldus</i> extract or boldina.....	43
Figura 4 – Effects of <i>P. boldus</i> extract and boldine against Fenton reaction induced by Fe <sup>2+</sup> (deoxyribose degradation).....	44
Figura 5 – Fe <sup>2+</sup> quelation by <i>P. boldus</i> and boldina.....	44
Figura 6 – Antioxidant activity of <i>P. boldus</i> extract and boldine against Fe <sup>2+</sup> -induced mitochondrial DFCH oxidation.....	45
Figura 7 – Reductive ability of <i>P. boldus</i> and boldine vs ascorbic acid.....	46

### ARTIGO 2

Figura 1 – Effect of <i>P. boldus</i> extract in the survival rate of flies exposed to Cu <sup>2+</sup> .....	51
Figura 2 – Effect of <i>P. boldus</i> extract in the negative geotaxis response (climbing) in flies exposed to Cu <sup>2+</sup> for four consecutive days.....	51
Figura 3 – (A) Cu <sup>2+</sup> levels after four consecutive days of exposure.....	52
(B) Cu <sup>2+</sup> levels after four days of exposure and one day of washing out of Cu <sup>2+</sup> ...52	
(C) Cu <sup>2+</sup> excretion after one day of exposure.....	52
Figura 4 – GST activity after exposure of flies to 1 mM and 3 mM of Cu <sup>2+</sup> in the presence or absence of <i>P. boldus</i> leaf extract.....	52
Figura 5 – AChE activity after exposure of flies to 1 mM and 3 mM Cu <sup>2+</sup> in the presence or absence of <i>P. boldus</i> leaf extract for four consecutive days.....	53
Figura 6 – Gene expression of Sod1 (A), TrxR1 (B), Cat (C) and Nrf2 (D).....	53
Figura 7 – Gene expression of Ace.....	53
Figura 8 – Gene expression of Ctr1A (A) and Atp7A (B).....	54

## LISTA DE ABREVIACÕES

AChE - Acetilcolinesterase  
Atox1 - Antioxidant Copper Chaperone (chaperona antioxidante de cobre)  
Atp7A e Atp7B - adenosina trifosfatase do tipo P transportadora de  $\text{Cu}^{2+}$   
CAT - Catalase  
CCS - Chaperona de cobre da superóxido dismutase  
Cox17 - cytochrome c oxidase copper chaperone (chaperona de cobre citocromo c oxidase)  
CTR1 E CTR2 - Proteínas de absorção de cobre 1 e 2  
 $\text{Cu}^{2+}$ - Cobre  
DCFH - DA - Diacetato de Diclorofluoresceína  
DMT-1- Transportador de metal divalente 1  
DW - Doença de Wilson  
EO - Estresse oxidativo  
ERNs - Espécies reativas de nitrogênio  
EROs- Espécies reativas de oxigênio  
 $\text{Fe}^{2+}$  - Ferro  
FPT - Ferroportina  
GPx - Glutathione peroxidase  
GSH - Glutathione reduzida  
GSSG - Glutathione oxidada  
GST - Glutathione-S-transferase  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de Hidrogênio  
HFE - Proteína produzida pelo gene da hemocromatose  
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)  
IRPs - Proteínas reguladoras de  $\text{Fe}^{2+}$   
MDA – Malondialdeído  
mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro  
MT - Metalotioneína  
Nrf2- Fator nuclear eritróide 2  
 $\cdot\text{OH}$  - Radical Hidroxil  
qPCR – Quantitative Polymerase chain reaction (reação quantitativa em cadeia da polimerase)  
RL – Radicais Livres  
-SH – Grupo Tio  
SNC – Sistema Nervoso Central  
Sod1- Superóxido dismutase 1  
-SS- pontes dissulfeto  
TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico  
TfR - Transferrina  
TrxR1- Tioredoxina redutase 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 O METAL FERRO.....	14
<b>1.1.1 Fe<sup>2+</sup> mitocondrial.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2 Causas do excesso de Fe<sup>2+</sup> no organismo.....</b>	<b>18</b>
1.2 O METAL COBRE.....	20
<b>1.2.1. Causas do excesso de Cu<sup>2+</sup> no organismo.....</b>	<b>23</b>
1.2.2.1 <i>Intoxicação ambiental.....</i>	23
1.2.2.2 <i>Disfunção metabólica: A Doença de Wilson.....</i>	24
1.3 MECANISMOS DE TOXICIDADE DE Fe <sup>2+</sup> e Cu <sup>2+</sup> .....	25
<b>1.3.1 Estresse oxidativo .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2 Disfunção mitocondrial induzida por Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.3 Orgãos alvo da toxicidade de Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.4 Estratégias terapêuticas na sobrecarga de Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.....</b>	<b>30</b>
1.4 TERAPIAS ANTIOXIDANTES NATURAIS.....	31
1.4.1 <i>Peumus boldus</i> como um antioxidante natural .....	32
1.5 <i>D. MELANOGASTER</i> COMO MODELO ALTERNATIVO EM ESTUDOS COM Cu <sup>2+</sup> .....	34
1.6 JUSTIFICATIVA .....	37
1.7 OBJETIVOS .....	38
<b>1.7.1 Objetivo geral.....</b>	<b>38</b>
<b>1.7.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>2 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 Artigo 1 .....	40
2.2 Artigo 2 .....	49
<b>3 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>5 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>63</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>

## APRESENTAÇÃO

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

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos, os quais se encontram no item **RESULTADOS**. Neste constam as seções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontradas no final desta tese, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos incluídos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta tese.

# 1 INTRODUÇÃO

Os metais de transição são importantes em uma ampla variedade de processos biológicos nos seres vivos. A homeostase dos íons metálicos deve ser mantida através de mecanismos rigorosamente regulados de absorção, armazenamento e excreção, pois o acúmulo pode prejudicar o funcionamento celular. O excesso dos metais está envolvido com dano oxidativo em macromoléculas biológicas, como DNA e proteínas, interferindo no crescimento e desenvolvimento celular (JOMOVA; VALKO, 2011). Os metais de transição ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) são elementos-traço vitais para os organismos vivos, pois atuam como cofatores específicos de muitas enzimas, catalisando reações de transferência de elétrons necessárias para o metabolismo celular. Os níveis celular e tecidual de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  são homeostaticamente determinados por proteínas reguladoras e chaperonas que controlam a captura, transporte e armazenamento destes metais (PEÑA et al, 1999).

Existe um interesse crescente no estudo dos efeitos tóxicos dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , pois estão envolvidos na etiologia de várias patologias, especialmente em doenças neurodegenerativas. Pesquisas anteriores demonstraram que o aumento dos níveis de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  está associado ao estresse oxidativo e ao dano oxidativo em cérebro e fígado de humanos expostos a estes metais (HWANG et al, 2014).

O excesso dos metais  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  no organismo pode ocorrer tanto por fatores ambientais, quanto genéticos. A sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  está principalmente relacionada com a hemocromatose hereditária (HH), uma doença autossômica recessiva associada a mutações do gene Hemocromatose Tipo 1 (HFE1), que resulta em aumento da absorção intestinal de ferro, levando ao acúmulo no organismo. Em uma situação de excesso de  $\text{Fe}^{2+}$ , este metal é depositado em vários órgãos internos, mas principalmente no fígado, levando a uma sobrecarga patológica (WINTERBOURN, 1995). A combinação de carga elevada de  $\text{Fe}^{2+}$ , somado ao metabolismo aeróbico, torna as mitocôndrias hepáticas um alvo para as espécies reativas de oxigênio (EROS), que induzem a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, prejudicando a cadeia de transporte de elétrons (MENA et al, 2015). A contaminação ambiental por  $\text{Cu}^{2+}$  pode ocorrer devido ao uso deste metal como pesticida e fungicida, além de ser descartado como resíduo industrial, sendo encontrado em excesso nas águas de diversos países (SCHWARZENBACH et al, 2010). O acúmulo de  $\text{Cu}^{2+}$  também pode estar ligado a uma doença hereditária conhecida como doença de Wilson, uma desordem autossômica recessiva causada por uma mutação no gene ATP7 do cromossomo 13, que prejudica a eliminação de  $\text{Cu}^{2+}$  por

excreção biliar, sendo este um dos principais mecanismos fisiológicos de eliminação do  $\text{Cu}^{2+}$  (BALAMURUGAN; SCHAFFNER, 2006; NYASAE et al, 2007). As doenças hereditárias do metabolismo do  $\text{Cu}^{2+}$  revelam a toxicidade deste metal principalmente em relação ao sistema nervoso, uma vez que as reações redox induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  podem ativar etapas críticas das vias apoptóticas que conduzem à neurodegeneração (ROTILIO et al, 2000).

Se não estiverem ligados a metaloproteínas durante o transporte ou armazenamento,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  livres são citotóxicos, podendo interagir com grupos sulfidril de proteínas inespecíficas, levando a formação de pontes dissulfeto, com consequente alteração da conformação proteica e inibição da atividade biológica (WAGGONER et al, 1999). Além disso,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  livres podem ser tóxicos devido as suas propriedades óxido-redutoras, o que os capacitam como catalisadores da geração de radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), uma espécie reativa de oxigênio (ERO), por meio da reação de Fenton ou de Haber-Weiss (LLOYD et al, 1997). A excessiva produção de EROs, excedendo as defesas antioxidantes celulares, leva a uma condição denominada estresse oxidativo, que está envolvida na patogênese de muitas doenças.

O extrato aquoso das folhas de *P. boldus*, popularmente conhecido como “boldo”, tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de desordens hepáticas e gastrointestinais. As propriedades terapêuticas do extrato de *P. boldus* têm sido associadas à presença de compostos polifenólicos, em especial ao alcaloide boldina (SPEISKY; CASSELS, 1994; FALÉ et al, 2012.). Estudos indicam que o extrato de *P. boldus* e boldina possuem propriedades antioxidantes em diferentes modelos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* (SCHMEDA-HIRSCHMAN et al, 2003; O'BRIEN et al, 2006; FALÉ et al, 2012; LAU et al, 2013).

Assim, a realização de pesquisas que investiguem se as propriedades farmacológicas do extrato de *P. boldus* podem oferecer proteção na hepatotoxicidade induzida pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , bem como possível efeito contra a toxicidade induzida por  $\text{Cu}^{2+}$ , podem contribuir efetivamente para a busca por tratamentos à base de terapias naturais.

A utilização da mosca da fruta *D. melanogaster* no estudo de doenças humanas oferece várias vantagens, entre elas genes em comum com os humanos, conservando aspectos relacionados às vias metabólicas e sinalizadoras celulares, bem como certos aspectos comportamentais (ritmos circadianos, aprendizagem e memória) (HIRTH, 2010). Durante a última década, a mosca *Drosophila melanogaster* tornou-se um importante modelo experimental para estudo dos mecanismos de regulação eucariótica de  $\text{Cu}^{2+}$  devido as proteínas transportadoras envolvidas na homeostasia deste metal serem altamente conservadas entre os eucarióticos (SOUTHON et al, 2013). Por este motivo, trata-se de um bom modelo alternativo

a ser usado nos estudos envolvendo a toxicidade do cobre e o possível efeito protetor de *P. boldus*.

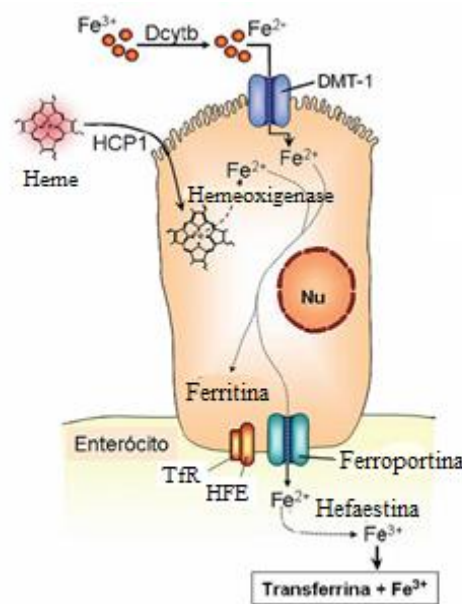
### 1.1. O METAL FERRO

O  $\text{Fe}^{2+}$  pertence ao grupo 8 da tabela periódica e é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre. Devido as suas propriedades químicas redox (BLEACKLEY; MACGILLIVRAY, 2011),  $\text{Fe}^{2+}$  contribui como um elemento central em processos relacionados ao metabolismo oxidativo em organismos vivos (WEBER et al., 2006). O elemento  $\text{Fe}^{2+}$  pode existir em diferentes estados de oxidação, variando de +2 a +6; no entanto, dentro dos sistemas biológicos, encontra-se ligado a metaloproteínas nos estados de oxidação +2 ou +3 (FARINA et al., 2006, LEVI; ROVIDA, 2009).

O  $\text{Fe}^{2+}$  é crítico para o funcionamento celular, utilização de oxigênio pelas células, atividade enzimática e funcionamento do sistema imunológico. Está presente como componente dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, de proteínas transportadoras ou de estoque de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), e também da fenilalanina hidroxilase (síntese da fenilalanina), histidina descarboxilase (síntese da histamina), catalase (defesa antioxidante), entre outros (BEARD et al., 1998; KOHGO et al., 2008). As principais fontes de  $\text{Fe}^{2+}$  do organismo humano são a dieta e a reciclagem de hemácias senescentes. Dos 13 a 18 mg de  $\text{Fe}^{2+}$  consumidos na dieta, somente 1 a 2 mg são absorvidos na forma inorgânica ou forma heme, e 20-30mg são diariamente reciclados através de um eficiente sistema de reutilização do metal. A absorção de  $\text{Fe}^{2+}$  no epitélio duodenal é regulada pelas necessidades do organismo, não havendo uma forma de excreção. Sendo assim, mecanismos homeostáticos evitam a absorção excessiva deste metal no intestino proximal e regulam a taxa de liberação do  $\text{Fe}^{2+}$  pela reciclagem das hemácias senescentes (GROPPER et al., 2013). A nível intestinal,  $\text{Fe}^{2+}$  é absorvido por diferentes mecanismos moleculares, dependendo de sua forma química e fonte dietética. A proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) absorve o  $\text{Fe}^{2+}$  obtido na dieta. Se estiver na forma  $\text{Fe}^{3+}$ , a enzima redutase citocromo b duodenal (Dcytb) catalisa a conversão de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , para que o metal possa ser absorvido por DMT-1. Além disso, a proteína transportadora de heme 1 (HCP-1), também conhecida como transporte de folato acoplado a prótons (PCFT), internaliza o ferro heme da dieta. Para isto, o ferro heme liga-se a membrana dos enterócitos duodenais e a HCP-1 importa-o para o meio intracelular (PANTOPOULOS et al., 2012). Dentro do enterócito, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, onde

é armazenado na forma de ferritina ou liberado para o sangue. A exportação de ferro do enterócito para o plasma é mediada pela ferroportina (FPT), que é regulada pela hepcidina e desempenha um papel crucial na regulação dos níveis plasmáticos de  $\text{Fe}^{2+}$ . Após ser exportado para o plasma, a enzima hefaestina converte o  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , permitindo a ligação com transferrina, uma glicoproteína de 80 KDa que transporta  $\text{Fe}^{3+}$  para as células em todo o corpo. Além de solubilizar o  $\text{Fe}^{2+}$ , atenua sua reatividade e facilita a liberação para o interior das células (LANE et al., 2013) (fig. 1).

**Figura 1.**



**Fig1. O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção de  $\text{Fe}^{2+}$  da dieta.** A proteína transportadora de metal divalente (DMT-1) absorve o  $\text{Fe}^{2+}$ . A enzima redutase citocromo b duodenal (Dcytb) catalisa a conversão de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , para a absorção por DMT-1. A proteína transportadora de heme 1 (HCP-1) internaliza o ferro heme da dieta. Dentro do enterócito, o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase, onde é armazenado na forma de ferritina ou exportado do enterócito para o plasma pela ferroportina. Após ser exportado para o plasma, a enzima hefaestina converte o  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , permitindo a ligação com transferrina. A proteína produzida pelo gene da hemocromatose (HFE) controla a afinidade do receptor da transferrina (TfR) ao complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -transferrina. Dentro do citosol a HFE forma um complexo com o TfR e detecta o seu grau de saturação, reduzindo, se necessário, o número desses receptores sobre a membrana celular. Fonte: Grotto, 2011

Para o transporte de ferro do plasma para as células, o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -transferrina interage com o receptor 1 da transferrina (TfR) presente na membrana plasmática, resultando em endocitose e captação celular do metal ligado à transferrina. Dentro do endossoma, a bomba



de prótons dependente de ATP encarrega-se de reduzir o pH, facilitando a liberação do  $\text{Fe}^{3+}$  da transferrina (FINBERG et al., 2011). O  $\text{Fe}^{3+}$  é convertido por uma ferreredutase a forma  $2+$  e transportado para o citoplasma pelo transportador DMT-1 presente no endossoma. Uma vez dentro da célula, o  $\text{Fe}^{2+}$  possui os seguintes destinos (LANE et al., 2013):

(I) É armazenado em ferritina;

(II) utilizado pelas vias metabólicas (por exemplo, importado para as mitocôndrias para utilização na síntese de clusters ferro-enxofre e heme e/ou incorporado em proteínas que requerem  $\text{Fe}^{2+}$  citoplasmático);

(III) Exportado para o exterior da célula pelo transportador ferroportina 1.

O  $\text{Fe}^{2+}$  celular que não é usado por ferroproteínas fica estocado, na sua maior parte, nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea na forma de ferritina citosólica, uma proteína de 450 kDa que tem uma capacidade limitada para até 4500 átomos de  $\text{Fe}^{2+}$ . Quando a quantidade total de  $\text{Fe}^{2+}$  no organismo é superior à que pode ser armazenada pela ferritina, ocorre a formação de hemossiderina, que corresponde à forma degradada e insolúvel da ferritina (AROSIO E LEVI et al., 2010).

A partir do fígado, o  $\text{Fe}^{2+}$  é mobilizado para tecidos periféricos pela transferrina plasmática. Em torno de 0,1% do ferro corporal circula no plasma ligado à transferrina, 65% do ferro está ligado à hemoglobina, 10% à mioglobina, citocromos e enzimas contendo  $\text{Fe}^{2+}$  e 25% é ligado às proteínas de armazenamento de  $\text{Fe}^{2+}$ , como ferritina e hemossiderina (WANG et al., 2011).

Se a carga corporal de  $\text{Fe}^{2+}$  for adequada e não houver necessidade deste micronutriente, sua absorção é modulada negativamente por diferentes mecanismos. Conforme mencionado anteriormente, o peptídeo hepcidina (liberado no sangue a partir dos hepatócitos em resposta à ingestão de  $\text{Fe}^{2+}$ ) estimula a diminuição da absorção intestinal deste metal e sua exportação dos enterócitos para o sangue (assim como o heme derivado de glóbulos vermelhos fagocitados por macrófagos no sistema retículo endotelial). A hepcidina liga-se à ferroportina e estimula a sua fosforilação e degradação, modulando desta forma a carga corporal de  $\text{Fe}^{2+}$  (WANG et al., 2016). Além disso, a afinidade do TfR ao complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -transferrina parece ser determinada pela proteína produzida pelo gene da hemocromatose, a HFE. Dentro do citosol o HFE forma um complexo com o TfR e detecta o seu grau de saturação, reduzindo, se necessário, o número desses receptores sobre a membrana celular (PAPANIKOLAOU et al., 2004).

A regulação também pode ser feita através da interação de proteínas reguladoras de  $\text{Fe}^{2+}$  (IRPs) e elementos responsivos ao  $\text{Fe}^{2+}$  (IREs). As IRP's, identificadas como IRP-1 e IRP-2, são proteínas sensíveis a presença de  $\text{Fe}^{2+}$  intracelular e podem se ligar aos IRE's, regiões não traduzidas presentes no mRNA (WANG; PANTOPOULOS, 2011). Se a ligação for na extremidade 5', ocorre inibição da tradução do mRNA em proteína. Se a ligação ocorrer na extremidade 3', ocorre inibição da degradação do mRNA e estabilização do mesmo, levando à tradução da proteína. Sendo assim, a síntese de proteínas de tráfico e armazenamento de  $\text{Fe}^{2+}$  (DMT1, receptor de transferrina e ferritina, etc.) é regulada pelo complexo IRP-IRE para aumentar ou diminuir a absorção deste metal, dependendo das necessidades fisiológicas (Wang; PANTOPOULOS, 2011; THEIL, 2012).

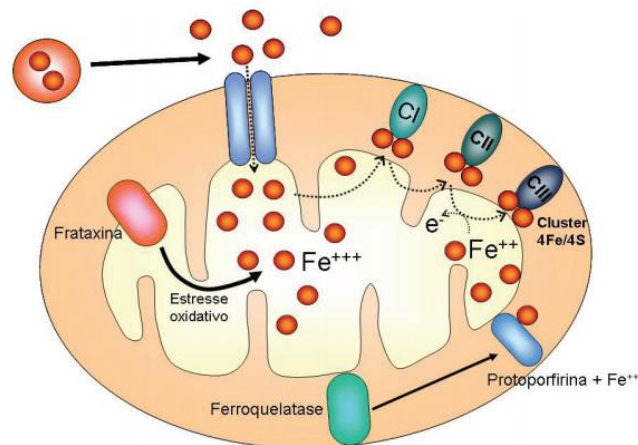
### 1.1.1 $\text{Fe}^{2+}$ mitocondrial

As mitocôndrias são organelas presentes nas células eucarióticas, cuja principal função é produzir energia pela respiração celular (fosforilação oxidativa) através da formação de trifosfato de adenosina (ATP), na presença de oxigênio. Além disso, as mitocôndrias têm um papel importante para o metabolismo do  $\text{Fe}^{2+}$ , já que é o único local onde ocorre a síntese do heme e a biossíntese dos *clusters Fe-S* (Fig. 2) (BELYAEVA et al., 2011, MENA et al., 2015). O heme, anel porfirínico cuja estrutura molecular consiste em quatro anéis pirrólicos interconectados por ligações metínicas (=CH-), possuem no centro um espaço apropriado para acomodar íons metálicos bivalentes, como o  $\text{Fe}^{2+}$  (RYTER; TYRRELL, 1997). Na síntese do heme, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é importante para a conversão do  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ , única forma química reconhecida pela ferroquelatase para ser incorporada ao anel pirrólico (PONKA, 1997). Os centros de ferro-enxofre (Fe-S) são cofatores que estão envolvidos em muitos processos bioquímicos. Em função do ferro variar entre os estados de oxidação +2 e +3, os centros Fe-S estão envolvidos em processos que envolvem transferência de elétrons. Os complexos mitocondriais I e III, as ferredoxinas e as hidrogenases são exemplos de proteínas contendo centros de Fe-S. Transportadores de membrana conhecidos como "ATP binding cassette subfamily B member 7" (ABCB7), localizam-se na membrana interna da mitocôndria e exportam os centros de Fe-S para o citosol. A proteína ABCB7 também desempenha um papel crítico na produção do heme (KRISHNAMURTHY et al., 2007).

A proteína responsável pela ligação do ferro mitocondrial é a frataxina, que além de destinar o metal à síntese do heme ou para a formação dos centros de Fe-S, ainda previne a

formação de radicais livres por evitar que o  $\text{Fe}^{2+}$  fique na forma livre (NANAYAKKARA et al., 2015). Todos estes processos tornam a mitocôndria um importante centro do metabolismo do  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo desta forma um alvo da toxicidade deste metal em caso de sobrecarga.

**Figura 2.**



**Fig. 2.  $\text{Fe}^{2+}$  mitocondrial.** Entrada do  $\text{Fe}^{2+}$  na mitocôndria e a regulação exercida pela frataxina na síntese do heme e dos centros de Fe-S. Fonte: Grotto, 2011

### 1.1.2 Causas do excesso de $\text{Fe}^{2+}$ no organismo

A sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  que excede a capacidade de ligação da ferritina leva a uma condição onde o  $\text{Fe}^{2+}$  fica livre (não ligado). Esta sobrecarga acontece em condições patológicas e pode ser classificada como primária ou secundária. A sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  primária decorre de um defeito genético da homeostasia do ferro, como por exemplo, o que se observa nos pacientes com hemocromatose hereditária (HH), que apresentam aumento inapropriado da absorção intestinal de  $\text{Fe}^{2+}$ . Embora a HH seja habitualmente associada a mutações do gene HFE (Hemocromatose Tipo 1), existem outros tipos de HH que envolvem diferentes genes, cujos principais estão listados na Tabela 1 (POWELL et al., 2016).

Tabela 1 - Principais síndromes relacionadas à hemocromatose hereditária

<b>Doença genética</b>	<b>Gene</b>	<b>Causa da sobrecarga de Fe</b>
Hemocromatose tipo 1 (Adulto)	HFE	Mutação do gene HFE1
Hemocromatose tipo 2A (juvenil)	HVJ	Mutação do gene da Hemojuvelina
Hemocromatose tipo 2B (juvenil)	HAMP	Mutação do gene da Hepsidina
Hemocromatose tipo 3	TfR <sub>2</sub>	Inativação do receptor 2 da transferrina
Hemocromatose tipo 4	SLC40A1	Mutação do gene da ferroportina
Aceruloplasminemia	Ceruloplasmina	Mutação no gene da ceruloplasmina
Atransferrinemia	Transferrina	Mutação no gene da transferrina

Fonte: (CANÇADO et al., 2010).

O quadro clínico da HH é bastante variável e depende do acúmulo de  $Fe^{2+}$ , que ocorre lenta e progressivamente por várias décadas. Os sinais clínicos mais frequentes são: hepatomegalia, hiperpigmentação da pele, esplenomegalia, diabetes mellitus, cirrose hepática, miocardiopatia e arritmia. O risco de carcinoma hepático é cerca de vinte vezes maior nos pacientes com HH (CANÇADO et al., 2010).

A ataxia de Friedreich (AF) também pode ser considerada uma doença que causa sobrecarga de  $Fe^{2+}$  primária, devido a expressão reduzida da frataxina (proteína que se liga ao  $Fe^{2+}$  na mitocôndria), resultando em acúmulo de  $Fe^{2+}$  mitocondrial. A AF é uma doença autossômica recessiva, e a expressão reduzida da frataxina tem origem na presença de uma expansão guanina-adenina-adenina (GAA) no gene. A GAA altera a estrutura da cromatina e induz a modificações epigenéticas que levam a uma transcrição reduzida do gene, induzindo perda de função. Pacientes com ataxia de Friedreich apresentam menor atividade de proteínas mitocondriais que contêm clusters Fe-S. A formação desses clusters é crítica para a prevenção do acúmulo do  $Fe^{2+}$  e do estresse oxidativo. Essa doença degenerativa é caracterizada por ataxia progressiva, perda sensorial e cardiomiopatia hipertrófica (BODENSTEINER, 2014).

Outra forma de acúmulo de  $Fe^{2+}$  mitocondrial ocorre devido a mutações no gene codificador do ABCB7, transportadores de membrana que localizam-se na membrana interna e exportam os clusters Fe-S e heme para o citosol. Mutações no gene codificador do ABCB7 estão associadas com ataxia cerebelar e anemia sideroblástica ligada ao X. Pelo menos três

mutações no gene ABCB7 foram identificadas, e resultam em modificações na estrutura da proteína ABCB7. Essas alterações interrompem o papel usual da proteína na produção de heme e na homeostase do ferro (FUJIWARA et al., 2013).

A sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  secundária é vista em doenças congênitas ou adquiridas que cursam com anemia hemolítica e/ou eritropoese ineficaz e requerem múltiplas transfusões. Se observa nos pacientes com talassemia maior, anemia falciforme, mielodisplasia, anemia de Fanconi, entre outras (GUILLAUD et al., 2012). A sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  secundária grave causa os mesmos sinais clínicos que a HH (CANÇADO et al., 2010).

## 1.2 O METAL COBRE

O  $\text{Cu}^{2+}$  é um elemento traço essencial para a sobrevivência de todos os seres vivos, desde células bacterianas até seres humanos (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996). O que torna este oligoelemento tão importante, assim como o  $\text{Fe}^{2+}$ , é a capacidade de adotar estados redox distintos, convertendo-se do estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para o reduzido ( $\text{Cu}^{1+}$ ), e vice-versa, servindo como cofator catalítico em reações redox de metaloenzimas que desempenham uma variedade de processos biológicos, incluindo a superóxido dismutase (defesa antioxidante) e a citocromo c oxidase (cadeia de transporte de elétrons). Além disso, também está envolvido na aquisição e no transporte de  $\text{Fe}^{2+}$ , no transporte e ativação de oxigênio, em eventos de transdução de sinal e na geração de ATP via fosforilação oxidativa (RENSING; MCDEVITT, 2013).

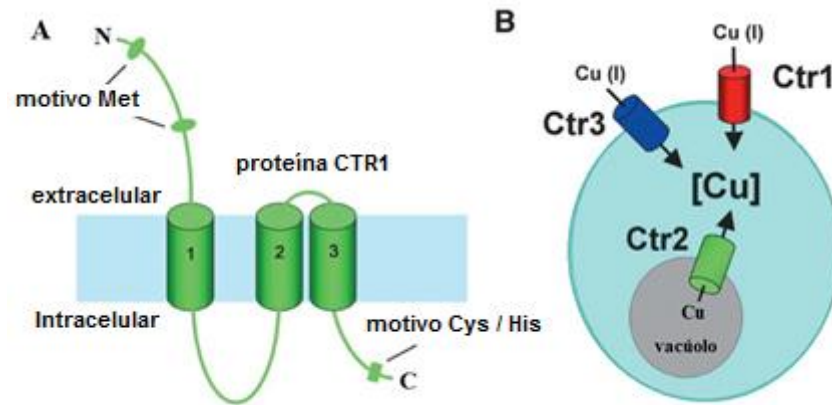
A homeostase do  $\text{Cu}^{2+}$  é mantida pela absorção intestinal, excreção biliar e armazenamento hepático. A ingestão dietética de  $\text{Cu}^{2+}$  por seres humanos foi estimada de  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal por dia para adultos e  $50\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal por dia na infância pela Organização Mundial de Saúde (OLIVARES et al., 1998).

Cerca de 30 a 50% do  $\text{Cu}^{2+}$  ingerido é absorvido no intestino delgado, e quantidades muito pequenas são absorvidas no estômago (TURNLUND et al., 1989). Após a passagem pela mucosa intestinal/estomacal, o  $\text{Cu}^{2+}$  é transportado no sangue ligado à albumina, histidina e transcupreína, sendo transportado via circulação porto-hepática ao fígado, que é o órgão-estoque. Após ser absorvido pelo fígado, o  $\text{Cu}^{2+}$  pode ser armazenado dentro dos hepatócitos, secretado no plasma ou excretado na bile. O  $\text{Cu}^{2+}$  nos hepatócitos é ligado à metalotioneína ou a cuproenzimas. O  $\text{Cu}^{2+}$  liberado do fígado é ligado, ainda no tecido hepático, a uma metaloproteína carreadora denominada ceruloplasmina, para transporte para os tecidos, mas

pode também ligar-se à albumina, à transcupreína e à histidina (TURNLUND et al., 1998). A ceruloplasmina (cobre mono amino oxidase, Cu-MAO) é uma fração alfa-2 globulina do sangue que contém até oito átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  nos estados cúprico e cuproso. Aproximadamente 60 a 90% do  $\text{Cu}^{2+}$  circulante no sangue está ligado à ceruloplasmina (HARRIS, 1998). Em situações em que há superávit, o  $\text{Cu}^{2+}$  se acumula no interior dos hepatócitos, em diferentes organelas, tais como núcleo, mitocôndria, microssoma, lisossomo, sendo posteriormente eliminado pela bile, a via de eliminação de cobre do organismo. Para tanto, o  $\text{Cu}^{2+}$  estocado no fígado deve ser ligado à metalotioneína hepática para ser posteriormente excretado (TURNLUND et al., 1989).

Para que o  $\text{Cu}^{2+}$  possa entrar para o interior das células, é necessária a redução de  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^{1+}$  por redutases transmembrana férrica/cúprica, Fre1 e Fre2 (Ferric/cupric reductase transmembrane 1 e 2, respectivamente) presentes na membrana plasmática (GEORGATSOU et al, 1997). A captação de  $\text{Cu}^{2+}$  é mediada pelos transportadores de alta afinidade da família Ctr, Ctr1 e Ctr3, e um sistema de baixa afinidade que desempenha função para manutenção da célula, o transportador Cu/Fe Fet3 (Iron transport multicopper oxidase) (HASSETT et al., 2000). Os transportadores da família Ctr são responsáveis pela absorção de 80% do cobre celular (fig. 3B). Possuem três domínios transmembranares, onde a região amino-terminal extracelular apresenta duas ou mais regiões ricas em metionina. A porção carboxi-terminal é citoplasmática e possui uma sequência de resíduos de cisteína e histidina, sendo estes resíduos importantes para coordenar a entrada de cobre durante o transporte intramembranoso (fig. 3A). O transportador CTR2, por sua vez, está localizado nas membranas de organelas vesiculares, tais como vacúolos, vesículas, endossomas e lisossomas. Sua função é possibilitar o movimento do cobre das organelas vesiculares para o citoplasma (Fig. 3B) (WEE et al., 2013).

**Figura 3.**



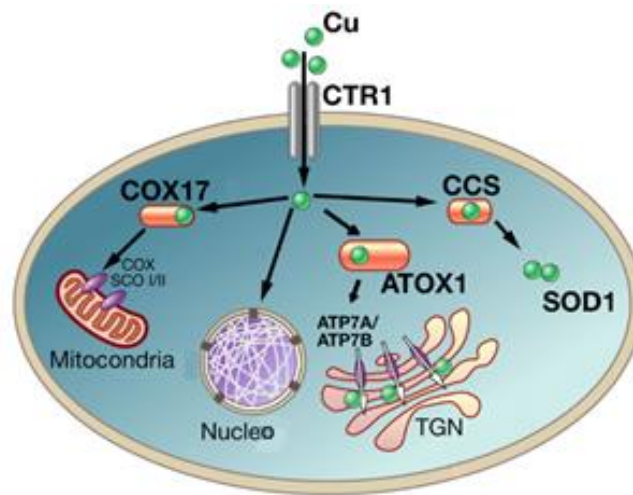
**Fig. 3. Transportadores de  $\text{Cu}^{2+}$  da família Ctr.** Possuem três domínios transmembranares, onde a região amino-terminal extracelular apresenta regiões ricas em metionina. A porção carboxi-terminal é citoplasmática e possui uma sequência de resíduos de cisteína (Cys) e histidina (His) (fig. 3A). O transportador CTR2 está localizado nas membranas de organelas vesiculares a nível intracelular (fig. 3B). Fonte: PEÑA *et al.*, 1999.

Uma vez dentro da célula, o cobre é ligado em (I) metalotioneínas, ou (II) transportado para a mitocôndria para a incorporação na enzima citocromo c oxidase, ou (III) destinado para a enzima Cu, Zn superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD) (IV), ou transportado para as Cu-ATPases tipo P (adenosina trifosfatase do tipo P transportadora de  $\text{Cu}^{2+}$ ) no trans-golgi para posterior incorporação à ceruloplasmina. As chaperonas e ATPases transportadoras de  $\text{Cu}^{1+}$  regulam a homeostasia, fornecendo  $\text{Cu}^{1+}$  para enzimas e proteínas e, ao mesmo tempo, impedindo que chegue a concentrações tóxicas (PEÑA *et al.*, 1999).

As chaperonas citosólicas de  $\text{Cu}^{1+}$ , citocromo c oxidase 17 (Cox17), superóxido dismutase (CCS) e proteína antioxidante humana 1 (Atox1) estão envolvidas na entrega específica de  $\text{Cu}^{1+}$  para as mitocôndrias, para a enzima Cu, Zn SOD e à via secretória, respectivamente. Nas mitocôndrias, a Cox 17 libera o cobre para as proteínas da membrana interna mitocondrial, Cox 11 e ScO1 (citocromo c oxidase 11 e síntese de citocromo c oxidase 1), as quais o transferem para o citocromo c oxidase. Já a chaperona de cobre da superóxido dismutase (CCS) fornece  $\text{Cu}^{1+}$  especificamente para a enzima Cu, Zn-SOD. A chaperona Atox1 fornece  $\text{Cu}^{1+}$  para os transportadores Cu-ATPases da via secretora, ATP7A e ATP7B. O complexo de Golgi abriga as Cu-ATPases, que transferem  $\text{Cu}^{2+}$  do citosol para o complexo de Golgi, a fim de incorporá-lo nas cuproenzimas. O complexo de Golgi também envia as ATPases para destinos apropriados pós-Golgi, onde ATP7A e ATP7B se translocam da rede trans-Golgi (TGN) em direção à superfície celular, a fim de facilitar o transporte de  $\text{Cu}^{1+}$  através das

membranas e garantir o fluxo intracelular deste metal, evitando seu acúmulo potencialmente tóxico (fig. 4) (PROHASKA et al., 2004). As Cu-ATPases são expressas na maioria dos tecidos e sua atividade de transporte é crucial para o desenvolvimento do sistema nervoso central, função hepática, formação de tecido conjuntivo e muitos outros processos fisiológicos (HASAN; LUTSENKO, 2012).

**Figura 4.**



**Fig.4. Esquema da do transporte e distribuição celular do  $\text{Cu}^{2+}$ .** O modelo ilustra a compreensão geral da homeostase do  $\text{Cu}^{2+}$  em eucariotos. O  $\text{Cu}^{2+}$  extracelular é transportado para dentro da célula principalmente por transportadores de alta afinidade da família Ctr. O  $\text{Cu}^{2+}$  é distribuído por um mecanismo envolvendo as metalochaperonas: citocromo c oxidase 17 (Cox17), superóxido dismutase (CCS) e proteína antioxidante humana 1 (Atox1). Fonte: (PEÑA et al., 1999).

### 1.2.1. Causas do excesso de $\text{Cu}^{2+}$ no organismo

#### 1.2.2.1 Intoxicação ambiental

$\text{Cu}^{2+}$  é um dos metais mais abundantes da natureza. As atividades de mineração durante o final do século XIX e século XX em várias partes do mundo contribuíram para a contaminação ambiental por  $\text{Cu}^{2+}$ , onde vários milhões de toneladas de rejeitos de minas foram gerados e liberados em solos e rios (BRIKI et al., 2015). Ao longo das últimas décadas, o desenvolvimento social e econômico tem estimulado uma grande demanda de  $\text{Cu}^{2+}$ , causando extensiva mineração e fundição deste metal (RODRIGUEZ et al., 2009, YU et al., 2016). A quantidade de  $\text{Cu}^{2+}$  em solos e rios próximos a zonas de mineração e fábricas de fundição ao



redor do mundo é maior quando comparado com o nível médio global (30 mg kg<sup>-1</sup>) (WCISLO et al., 2002, CHENG et al., 2011). Vários estudos têm mostrado que o teor de Cu<sup>2+</sup> em alimentos é influenciado pelas atividades de mineração e que a dieta com alimentos contaminados é a principal fonte de exposição nestas áreas (YU et al., 2016). Além disso, o uso de pesticidas contendo cobre na agricultura, pode resultar na transferência de quantidades substanciais deste metal para o meio ambiente devido a perdas de pesticida das culturas por escoamento superficial e lixiviação, resultando em contaminação das águas superficiais e subterrâneas, respectivamente, além da contaminação do solo (MASAKA; MUUNGANIRWA, 2007, HUGUENOT et al., 2010, BALINT et al., 2015). Intoxicação com Cu<sup>2+</sup> também está relacionada com o uso de preparações antimicrobianas ou dispositivos contraceptivos intrauterinos contendo nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), que podem atravessar a barreira sangue-cérebro e exercer efeitos neurotóxicos por acumular-se no sistema nervoso central (DONALDSON; POLAND, 2012; SUN et al., 2012). Um relato de caso relacionou o uso inadvertido da administração de suplementos de cobre com toxicidade hepática após uma exposição prolongada (O' DONOHUE et al., 1993), embora suplementação crônica seja extremamente rara. Além da ingestão dietética e da exposição ambiental, o nível de Cu<sup>2+</sup> pode ser influenciado por outros fatores, como a atividade da glândula adrenal. Os hormônios adrenais promovem a produção hepática de ceruloplasmina, principal proteína de ligação ao Cu<sup>2+</sup> no organismo. Assim, o mau funcionamento do fígado e insuficiência adrenal podem causar acúmulo de Cu<sup>2+</sup> nos tecidos (FIELDS et al., 1991). Além disso, o zinco dietético (Zn<sup>2+</sup>) pode alterar o nível de Cu<sup>2+</sup>. Como antagonista do Cu<sup>2+</sup>, a deficiência de Zn<sup>2+</sup> está associada ao acúmulo de Cu<sup>2+</sup> nos órgãos (HALL et al., 1979).

#### *1.2.2.2 Disfunção metabólica: A Doença de Wilson*

A doença de Wilson (DW), também conhecida como degeneração hepatolenticular, é um transtorno autossômico recessivo que causa acúmulo de Cu<sup>2+</sup> devido a uma mutação no transportador de Cu<sup>1+</sup>, ATP7B (WILSON, 1912). O gene ATP7B codifica uma proteína de 1456 aminoácidos e 6 domínios de ligação com o Cu<sup>2+</sup>. A "proteína da doença de Wilson" é uma adenosina trifosfatase do tipo P que transporta o cobre para cupro-enzimas recentemente sintetizadas na rede trans-Golgi (RTG), além de exportar o excesso de cobre da RTG para o meio extracelular (FATEMI; SARKAR, 2002; LUTSENKO et al., 2002, LUTSENKO et al., 2003). Consequentemente, mutações no gene ATP7B levam ao impedimento da secreção biliar de cobre, causando acumulação hepática deste metal, além de uma sobrecarga em outros

órgãos-alvo, como gânglios da base e córnea (ROBERTS; SCHILSKI, 2003). O fígado é o principal órgão para a deposição de cobre na DW, podendo resultar em um grande espectro de manifestações que vão desde pequenas anormalidades nos testes de função hepática até hepatite aguda ou crônica e cirrose (BEINHARDT et al., 2014). A deposição excessiva de cobre no cérebro pode causar distúrbios neurológicos, como sintomas similares ao de Parkinson, incluindo bradicinesia, tremor e distonia, ou sintomas neuropsiquiátricos, como hipomestesia, disgnose e distúrbios de personalidade (SENIOW et al., 2004, ZIMBREAN; SCHILSKY, 2014). Esta doença possui uma incidência global de 1 para cada 30.000 pessoas. No entanto, um estudo recente sugeriu que a incidência pode ser muito maior, de 1 em 7000. A prevalência do portador heterozigótico e assintomático de um gene mutado para doença de Wilson é 1 em 90 (ROBERTS, 2011).

### 1.3 MECANISMOS DE TOXICIDADE DO $Fe^{2+}$ E $Cu^{2+}$

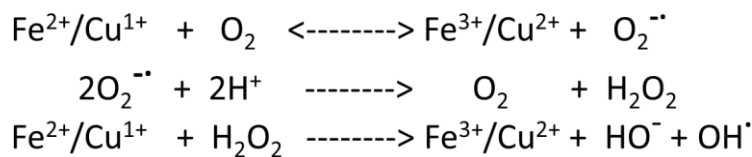
#### 1.3.1 Estresse oxidativo

Sabe-se que todos os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para uma ampla variedade de processos biológicos, como o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, entre outros. Estes processos podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições fisiológicas. As EROs incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ). Dentre estas espécies, estão os radicais livres, um termo utilizado para qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, como ânion superóxido e radical hidroxil. Outras são agentes oxidantes não radicalares, como o peróxido de hidrogênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de EROs (HALLIWELL, 1992; LUSHCHAK, 2014). Normalmente estas espécies são neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes nos organismos, que podem ser enzimáticos, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), entre outros, ou não-enzimáticos, como glutathione (GSH), tocoferóis (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C). Um aumento na produção de EROs ou redução da capacidade antioxidante celular total culmina com estresse oxidativo, um fenômeno caracterizado por elevadas concentrações de EROs, as quais podem causar danos às estruturas moleculares de componentes celulares, tais como, lipídios, proteínas,

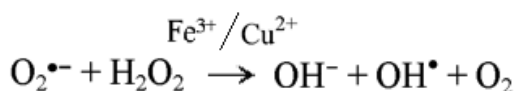
carboidratos e DNA, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (SIES, 2015).

Em condições normais, os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  estão ligados a grupos prostéticos enzimáticos, proteínas transportadoras e metaloproteínas, condições que minimizam a probabilidade da participação dos mesmos em reações redox e garante o fornecimento destes metais para proteínas alvo. Em uma situação de sobrecarga, o excesso de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  que ficam na forma livre (não ligada), podem participar de reações que resultam na produção de EROs, como as reações de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990, KOPPENOL, 2001). Neste caso, as formas armazenadas cúprica e férrica ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) são reduzidas pelo ânion superóxido ou agentes redutores tais como ácido ascórbico ou GSH para  $\text{Cu}^{1+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . A reação de Fenton/Haber-Weiss inclui uma interação direta do  $\text{Cu}^{1+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (esquemas 1 e 2), levando a formação do radical hidroxil, um potente oxidante (WINTERBOURN, 1995).

**Esquema 1:** Reação de Fenton



**Esquema 2:** Reação de Haber Weiss

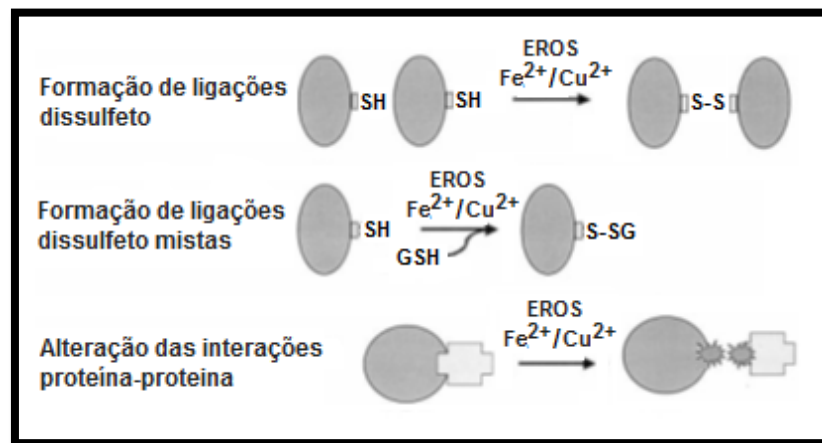


Neste contexto, acredita-se que a toxicidade do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  seja mediada, pelo menos em parte, pela geração de EROs via reação de Fenton e/ou Haber-Weiss, que levam ao uso excessivo do sistema antioxidante, causando estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

Os efeitos tóxicos do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  estão também relacionados com a alta afinidade destes metais por grupos sulfidrila e amino de proteínas. A reação de oxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  nos resíduos de aminoácidos leva a formação de ligações inter/intramoleculares, como pontes dissulfeto, que conseqüentemente alteram a conformação proteica e causam inibição da atividade biológica (MARKLUND et al, 1997; MATTIE & FREEDMAN, 2004, MUSACCO-SEBIO et al, 2014). Esta reação influencia a atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx,

SOD (NISKA et al., 2015), e de agentes redutores, como a glutathiona reduzida (GSH, L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) (FALFUSHYNSKA et al., 2011, JIANG et al., 2015). A GSH é um antioxidante celular cuja capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiolato (-SH) (SIVERTSEN, 1980, DROCHIOIU et al., 2013, WHITE et al., 2003). Sob condições de excesso de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , há um desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de glutathiona oxidada (GSSG), ocorrendo oxidação dos grupos sulfidrila pela reação direta com  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  e oxidação via EROs. O excesso de GSSG ocasiona um ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH), como a enzima glutathiona S-transferase (GST) (GAGGELLI et al., 2006; SMITH et al., 2014, JIANG et al., 2015). Esta enzima possui sua estrutura nativa rica em cisteína, e tem a atividade enzimática prejudicada por depleção do substrato (GSH) e por oxidação dos grupos -SH inter e intramoleculares, que resulta na formação de agregados proteicos que inativam a enzima (fig. 5). Logo,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  podem causar desequilíbrio nos níveis de GSH, consequentemente alterando a atividade da GST e favorecendo a geração de eventos oxidativos (MATTIE; FREEDMAN, 2004).

**Figura 5.**



**Fig. 5. Formação de ligações dissulfeto.** Esquema representa a formação de pontes dissulfeto (S-S), que ocorrem devido a oxidação de grupos tíóis reduzidos (-SH) causada diretamente por  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , e/ou pelo estresse oxidativo gerado por estes metais, via EROs (espécies reativas de oxigênio). A formação das ligações dissulfeto podem envolver grupos tíóis da mesma proteína, ou podem ocorrer entre diferentes proteínas (S-SG). A formação de ligações dissulfeto leva a alteração da conformação proteica e das interações proteína-proteína, resultando em inibição da atividade proteica. Fonte: JOMOVA; VALKO, 2011.

O estresse oxidativo induzido por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  também pode estimular a via de sinalização do elemento de resposta antioxidante (ARE), que controla a expressão de genes cujos produtos proteicos estão envolvidos na desintoxicação e neutralização de agentes oxidantes (WANG et al., 2010; DU et al., 2013, MORALES et al., 2014; SILVA-GOMES et al., 2014; JIANG et al., 2014, SONG et al., 2014). Esta via é regulada pelo fator nuclear (eritróide-2) (Nrf2). A ativação do fator de transcrição Nrf2 envolve a modificação oxidativa ou covalente de resíduos de cisteína em Keap1 (proteína repressora na qual Nrf2 está ligado) por EROS. A interação de Keap1 com Nrf2 é desfeita, causando a liberação de Nrf2 e Keap1, e a migração de NRF2 para o núcleo onde interage com o elemento de resposta antioxidante para induzir a transcrição de genes antioxidantes (JIANG et al., 2015).

### **1.3.2 Disfunção mitocondrial induzida por $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Cu}^{2+}$**

Outro ponto importante sobre o excesso de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  são os efeitos tóxicos destes metais na mitocôndria. Embora as mitocôndrias tenham um papel importante no metabolismo de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , a combinação de carga elevada destes metais somado ao metabolismo aeróbico tornam-nas um alvo das espécies reativas (BELYAEVA et al., 2011, MENA et al., 2015). Evidências sugerem que a mitocôndria está diretamente envolvida na patogênese da lesão tecidual causada por acúmulo destes metais no fígado (WOODS et al., 1989; SU et al., 2011; KOROTKOV; SARIS, 2011). O estresse oxidativo associado a altas concentrações  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  e/ou  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  livre na matriz mitocondrial pode causar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM). Este evento é caracterizado por aumento progressivo da absorvidade da membrana mitocondrial interna, que se torna permeável à água, íons e outras moléculas com peso molecular até 1,5 KDa. Isto porque o estresse oxidativo mitocondrial promove a oxidação de tióis de proteínas da membrana interna. Logo, a oxidação de tióis resulta em agregação protéica e a consequente formação do PTPM. Nestas condições, ocorre o aumento de cálcio intramitocondrial, diminuição do transporte de elétrons, colapso da fosforilação oxidativa e diminuição da síntese de ATP. Devido ao influxo de moléculas para a matriz mitocondrial, há expansão do seu volume (inchaço mitocondrial), resultando no rompimento da membrana mitocondrial externa, com consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, as quais ativam vias de morte celular (SU et al., 2011, GRINGS et al., 2014). No caso do  $\text{Cu}^{2+}$ , o íon pode também reagir diretamente com grupos tiol de peptídeos de baixo peso molecular, como a GSH. (SAPORITO-MAGRIÑÁ et al., 2017). Além disso,

pode ocorrer a liberação de  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de moléculas como a ferritina ou agregados ferro-sulfurosos mitocondriais encontrados nos complexos I e III após interação com EROs. O  $\text{Fe}^{2+}$  liberado nesta situação contribui para a produção de radicais hidroxil (LIOCHEV, 1996). A disfunção mitocondrial observada em sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  também tem sido associada com peroxidação de fosfolípídeos da membrana mitocondrial. Em condições de EO, as espécies reativas formadas podem atacar uma diversidade de biomoléculas, sendo os ácidos graxos encontrados nas membranas importantes alvos. Sendo assim,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  estão envolvidos na iniciação e propagação da peroxidação lipídica (SANTOS et al., 2011). Em suma, os processos mitocondriais gerados por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  incluem peroxidação de fosfolípidos, oxidação de proteínas e inibição respiratória mitocondrial, fenômenos que alteram o balanço redox e podem culminar com a liberação de fatores pró-apoptóticos e morte celular (SEKINE et al., 2015).

### 1.3.3 Orgãos alvo da toxicidade de $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Cu}^{2+}$

Embora a exposição crônica de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  leve ao excesso destes metais nos gânglios da base, cérebro, coração, pâncreas, etc., os efeitos tóxicos mais pronunciados ocorrem no fígado e no SNC. Por serem metabolizados e armazenados no fígado, o excesso de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  pode causar necrose hepatocelular, resultando em insuficiência hepática. No SNC,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  são considerados agentes oxidantes envolvidos em várias doenças neurodegenerativas envolvendo o acúmulo de agregados proteicos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, entre outras (DUSEK et al., 2015). As doenças hereditárias do metabolismo do  $\text{Fe}^{2+}$  (hemocromatose) e  $\text{Cu}^{2+}$  (doença de Wilson), também indicam a toxicidade destes metais para o sistema nervoso. As reações redox induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  somadas a perda da função mitocondrial, ativam etapas críticas das vias apoptóticas que conduzem à neurodegeneração. Neste cenário, uma enzima utilizada como marcador em estudos neurotoxicológicos é a acetilcolinesterase (AChE). A atividade da AChE é essencial na transmissão dos impulsos nervosos, atuando nas sinapses colinérgicas e na junção neuromuscular. A AChE promove a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), finalizando deste modo a transmissão sináptica (PICCIOTTO et al., 2012). A medição da atividade desta enzima é um parâmetro confiável para avaliar a ação de xenobióticos, incluindo metais pesados (LIONETTO et al., 2013). Vários estudos mostraram que os metais  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  inibem a atividade da AChE em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (POHANKA, 2014; HAVERROTH et al., 2015; SARRIA et al., 2016, GROSSKOPF et al., 2017). De um modo geral, a compreensão dos

mecanismos envolvidos nesses efeitos tóxicos é essencial para o desenvolvimento de possíveis agentes farmacológicos que possam vir a atuar como terapia no tratamento de doenças associadas com a sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . Neste sentido, agentes com potencial antioxidante podem ser promissores e alvo de estudos translacionais.

### **1.3.4 Estratégias terapêuticas na sobrecarga de $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Cu}^{2+}$ .**

As abordagens terapêuticas para o tratamento da sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$  são limitadas e envolvem basicamente o uso de agentes quelantes, que podem também causar toxicidade. No caso do  $\text{Fe}^{2+}$ , o tratamento inicial compreende a remoção do excesso deste metal do organismo por meio de flebotomia ou de sangria terapêutica (CAPPELLINI et al., 2008). Se necessário, o uso do quelante desferroxamina ou mais recentemente, novos quelantes como o deferasirox ou deferiprona, administrados por via oral, têm sido usados por pessoas com sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$ . Os efeitos adversos destes quelantes incluem distúrbios de visão e audição, disfunção renal grave, retardo no crescimento, síndrome da angustia respiratória, e ainda aumento da susceptibilidade a infecções (MARSELLA; BORGNA-PIGNATTI, 2014). Penicilamina e trientina são quelantes usados na terapia da doença de Wilson e em casos de sobrecarga de  $\text{Cu}^{2+}$ . Apesar de eficazes, possuem grande toxicidade, causando distúrbios neurológicos em cerca de 50% dos pacientes que já apresentam danos neuronais em função da doença (WEISS et al., 2013). O zinco, que bloqueia a absorção de cobre, possui menos efeitos colaterais, porém a eficácia é lenta e pode levar de 6-9 meses até o controle da toxicidade. O tetratiomolibdato, outro fármaco usado no tratamento da doença de Wilson, forma um complexo com o  $\text{Cu}^{2+}$  livre e ligado a metaloproteínas. Pode se complexar com o  $\text{Cu}^{2+}$  de alimentos e o  $\text{Cu}^{2+}$  sanguíneo, eliminando este metal com mais eficiência quando comparado com o  $\text{Zn}^{2+}$  (WIGGELINKHUIZEN et al., 2009). Apesar das terapias já existentes, tratamentos que possam auxiliar na doença de Wilson são escassos. Por se tratar de uma doença relativamente rara, as empresas farmacêuticas geralmente não estão interessadas em procurar fármacos que visem minimizar os efeitos do  $\text{Cu}^{2+}$  sem causar efeitos colaterais, devido ao escasso retorno financeiro que as pesquisas nesta área gerariam (PARISER; GAHL, 2014). Os produtos naturais têm sido indicados como potenciais agentes terapêuticos contra a toxicidade do  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , devido às suas propriedades antioxidantes e quelantes (DUTTA et al., 2014; GHATE, et al., 2015, KONTOGHIORGHE et al., 2015, DUMAN et al., 2016; KHALILI et al., 2016, AZMAT et al., 2016; BHOWMIK et al., 2017). A eficácia terapêutica dos compostos polifenóis

encontrados em preparações naturais usadas na medicina popular pode estar ligada a estas duas propriedades.

#### 1.4 TERAPIAS ANTIOXIDANTES NATURAIS

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de produtos naturais, tem levado à descoberta de moléculas promissoras para o tratamento de várias doenças. Dentre os compostos presentes na composição de extratos de plantas, possivelmente responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas, estão os compostos fenólicos e alcaloides, que apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (HUANG et al., 2010; KOKOTKIEWICZ et al., 2010, MCKAY et al., 2006, ZHAO et al., 2016). Todavia, dados da literatura indicam que parte das propriedades farmacológicas dos extratos brutos de plantas pode estar relacionada aos efeitos sinérgicos de diferentes classes de compostos presentes nestes extratos (AHERNE; O'BRIEN, 2002, BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2014).

Produtos naturais também têm sido amplamente estudados com a finalidade de se encontrar alternativas para o tratamento da toxicidade induzida por metais pesados (MONEIM et al., 2014; NANNEPAGA et al., 2014, GHATE, et al., 2015, ABBAOUI et al., 2017; MALLYA et al., 2017; GRISSA et al., 2017; BAHAR et al., 2017), como o  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  (DUTTA et al., 2014; KONTOGHIORGHE et al., 2015, DUMAN et al., 2016; KHALILI et al., 2016, AZMAT et al., 2016; BHOWMIK et al., 2017).

Polifenóis, especialmente os flavonoides, são moléculas a que se atribui grande parte dos efeitos farmacológicos das plantas. Polifenóis são metabólitos secundários biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2000) e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona (C6-C3-C6) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT, 2001), sendo mais de 4000 diferentes estruturas já identificadas e descritas. Esta estrutura é importante para reações de oxido-redução, que permite desempenhar um papel na neutralização de radicais livres (NARAYANA et al., 2001). Algumas características estruturais influenciam na atividade antioxidante/reactividade dos compostos fenólicos, como o número de hidroxilas presentes na molécula, nas configurações orto, meta e para de dois ou mais grupos hidroxil em um anel de polifenol. A presença de anéis não aromáticos e/ou aromáticos nos fenóis policíclicos também pode influenciar na reatividade dos polifenóis, assim como a presença de duplas ligações



presentes na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CHCOOH), que participam da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado. Além disso, podem variar de acordo com substituições incluindo hidrogenação, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

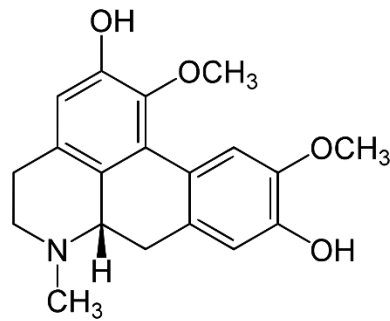
Além dos conhecidos mecanismos de ação antioxidante de compostos fenólicos (neutralização de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio), um fator importante é a capacidade de se ligar aos metais de transição, atuando como quelantes. Para que possam se coordenar com íons metálicos, os compostos fenólicos devem ter pelo menos dois locais de ligação para formar um complexo com o metal (CHERRAK et al., 2016). Diferentes classes de compostos fenólicos têm sido investigadas pela sua capacidade de quelação, incluindo flavonoides (MLADĚNKA et al., 2011) e chalconas (MOJARRAB et al., 2013). Desta forma, quelantes naturais e/ou sintéticos têm sido estudados a fim de verificar a possibilidade de aplicação em terapias de doenças relacionadas com estresse oxidativo e desequilíbrio no status fisiológico de metais (MONEIM et al., 2014; NANNEPAGA et al., 2014, DUTTA et al., 2014; GHATE, et al., 2015, KONTOGHIORGHE et al., 2015, DUMAN et al., 2016; KHALILI et al., 2016, ABBAOUI et al., 2017, GRISSA et al., 2017; BAHAR et al., 2017, BHOWMIK et al., 2017). Um exemplo é o uso de quelantes destinados ao tratamento de doenças neurodegenerativas, como doenças de Alzheimer e Parkinson, por serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seus efeitos farmacológicos a nível de SNC (MANDEL et al., 2007).

#### **1.4.1 *Peumus boldus* como um antioxidante natural**

*Peumus boldus*, *P. boldus*, uma planta popularmente conhecida como boldo, é uma espécie arbórea nativa do Chile, pertencente à família Monimiaceae (fig. 6). Como o boldo só cresce em abundância no Chile, este país tem sido durante décadas a única fonte original de folhas e cascas, que são exportadas para várias partes do mundo, principalmente para a Argentina, Brasil, Itália, França e Alemanha (CASSELS; SPEISKY, 1991).

**Figura 6-****Fig.6.** Planta *Peumus boldus*. **Fonte:** plantsystematics.org

*P. boldus* é reconhecida como erva medicinal em várias farmacopéias, e a infusão das folhas é recomendada para o tratamento de espasmos gastrointestinais, distúrbios dispépticos e doenças hepatobiliares (LANHERS et al., 1991, RUIZ et al., 2008). Os flavonoides são os principais componentes do extrato aquoso de *P. boldus*, seguido de alcaloides e óleos essenciais (SIMIRGIOTIS; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2010). Isto confere ao extrato de boldo uma potente atividade antioxidante (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2003, FALÉ et al., 2012, SOTO et al., 2014). Na fração de flavonóides, a catequina é indicada por contribuir com 35,6% da capacidade antioxidante da infusão das folhas de boldo, cujo conteúdo é estimado em 2,25% do total, enquanto o de alcalóides totais, em equivalente de boldina, é cerca de 0,06%, resultando em uma relação média entre catequina e boldina de 37:1 (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2003). Fernández et al. (2009) mostrou que a o extrato aquoso das folhas de boldo protegeu o tecido hepático de ratos contra o dano oxidativo causado por cis-diaminodicloroplatina devido a sua potente atividade antioxidante na concentração 50mg/Kg. Também foi evidenciado que o tratamento com 5mg/mL do extrato aquoso de boldo reduziu a toxicidade induzida por manganês em *D. melanogaster* (BIANCHINI et al., 2016). Vários estudos na literatura atribuem, pelo menos em parte, a atividade antioxidante do boldo à boldina, principal componente extraído da fração alcaloide das folhas de boldo. De fato, boldina (fig. 7) têm sido indicada como um potente antioxidante em sistemas biológicos e não biológicos (SPEISKY et al., 1991; JANG et al., 2000; JIMÉNEZ et al., 2000; O'BRIEN et al., 2006, LAU et al., 2013; HERRERA et al., 2014) devido à oxidação da estrutura aporfinica (MUTHNA et al., 2013).

**Figura 7.****Fig. 7. Estrutura molecular do alcaloide boldina. Fonte:** Abood *et al.*, 2014.

Estudos relacionados demonstraram que boldina pode restaurar a atividade de algumas enzimas, tais como GST em células Hepa-1 (KUBÍNOVÁ *et al.*, 2001) e GPX nas mitocôndrias de fígado de ratos (JANG *et al.*, 2000). A ação antioxidante da boldina também foi associada com a capacidade da molécula em atenuar a inativação do citocromo P4502E1 humano e inibir a peroxidação lipídica induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ -cisteína em membranas microsossomais de fígado de ratos (KRINGSTEIN; CEDERBAUM, 1995). A avaliação do potencial antioxidante da boldina e um derivado semi-sintético em modelos de oxidação *in vitro* e *in vivo* mostrou que a boldina diminuiu a oxidação *in vivo* da lipoproteína de baixa densidade (LDL); e em estudos com camundongos LDLR<sup>-/-</sup>, a administração de boldina ou de seu derivado (1 mg/ kg ao dia), durante 12 semanas, reduziu a formação de lesões aterogênicas (SANTANAM *et al.*, 2004).

Neste contexto, considerando a participação do estresse oxidativo na toxicidade mediada por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , e a presença de compostos com propriedades antioxidantes na composição de *P. boldus*, torna-se interessante investigar o potencial antioxidante e quelante do extrato bruto desta planta, bem como o efeito do alcaloide isolado boldina, com a finalidade de indicar se *P. boldus* poderia ser usado em casos de intoxicação com estes metais.

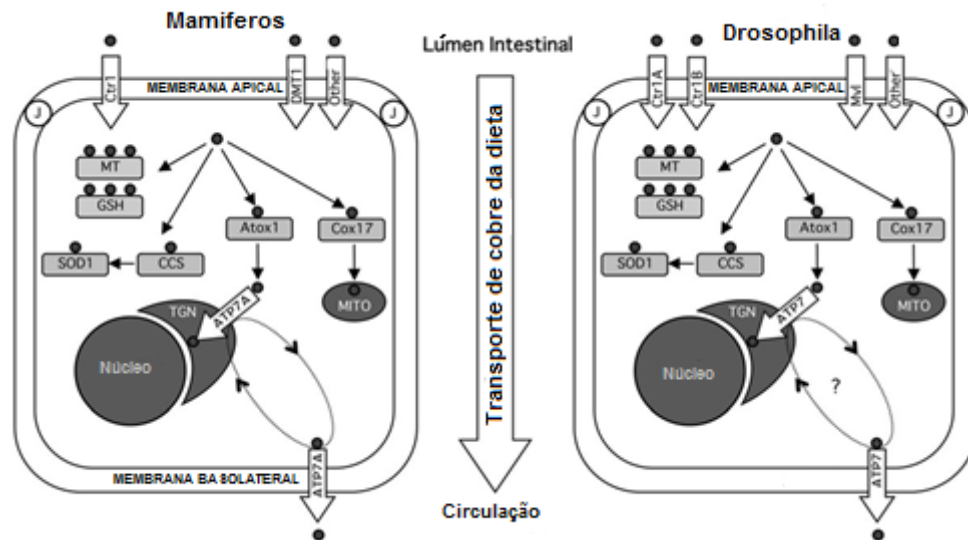
### **1.5 *Drosophila melanogaster* como modelo alternativo em estudos com cobre.**

A utilização da mosca da fruta *D. melanogaster* no estudo de doenças humanas oferece várias vantagens, entre elas, genes em comum com os humanos, conservando aspectos relacionados às vias metabólicas e sinalizadoras a nível celular, bem como certos aspectos comportamentais, como ritmo circadiano, aprendizagem e memória, sendo que cerca de 75% dos genes causadores de doenças humanas possuem um homólogo funcional em *D.*

*melanogaster* (UGUR et al., 2016). Na última década, a mosca *D. melanogaster* tornou-se um organismo modelo importante para a elucidação dos mecanismos reguladores de  $\text{Cu}^{2+}$  em humanos devido a identificação de genes altamente conservados em *drosophila* e mamíferos que são relacionados a homeostase do  $\text{Cu}^{2+}$  (NORGATE et al., 2007).

No trato digestivo, o intestino médio de *D. melanogaster* se compara aos enterócitos duodenais de humanos, onde a absorção dietética de  $\text{Cu}^{2+}$  ocorre por meio dos transportadores CTR1 (ZHOU et al., 2003). O corpo gorduroso é o equivalente mais próximo ao sistema hepático de mamíferos, apesar de *D. melanogaster* não ter um mecanismo de excreção biliar e eliminar o excesso de  $\text{Cu}^{2+}$  da hemolinfa por captação via túbulos de Malpighi, onde irá ser excretado no intestino grosso (LIU et al., 2009). Em mamíferos, o  $\text{Cu}^{2+}$  circulatório é predominantemente ligado à ceruloplasmina, albumina, 2-macroglobulina e alguns peptídeos menores e aminoácidos (TURNLUND, 1989). Em *D. melanogaster*, os membros da família da multicoide oxidase (MCO) são os responsáveis pelo transporte de  $\text{Cu}^{2+}$ , e tem atividade de ferroxidase semelhante à ceruloplasmina (BETTEDI et al., 2011, LANG et al., 2012). A nível celular, a absorção de cobre ocorre através de CTR1 e CTR3 em mamíferos, enquanto que as células de *D. melanogaster* utilizam os transportadores homólogos Ctr1A e Ctr1B (fig. 5). Ctr1 humana também é funcional quando expressa em *Drosophila*, revelando um alto grau de conservação entre os transportadores CTR de mamíferos e *D. melanogaster* (HUA et al., 2010). O transportador de íons metálicos Divalente 1 (DMT1) também pode contribuir para absorção de cobre, assim como o Malvolio (Mvl), único ortólogo de *D. melanogaster* para DMT1. Embora sejam funcionalmente importantes, estes transportadores não contribuem de uma forma muito significativa, tendo em vista que as proteínas Ctr são responsáveis pela maior parte da absorção dietética de  $\text{Cu}^{2+}$  (Southon et al., 2008). A rota de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$  com chaperonas, metalotioneína (MT) ou glutationa (GSH) segue uma notável semelhança entre mamíferos e *D. melanogaster*. Permanece incerto se, em *D. melanogaster*, os transportadores ATP7 retornam ao complexo de golgi após o transporte de cobre para a membrana basolateral, completando um ciclo como ocorre em humanos (fig. 8) (SOUTHON et al., 2013).

**Figura 8.**



**Fig 8. Semelhança entre o transporte celular de  $\text{Cu}^{2+}$  em mamíferos e *D. melanogaster*.** A absorção dietética de  $\text{Cu}^{2+}$  ocorre por meio dos transportadores de cobre 1 e 3 em mamíferos (CTR1 e CTR3) enquanto que as células de *D. melanogaster* utilizam os transportadores homólogos Ctr1A e Ctr1B. O transportador de íons metálicos Divalente 1 (DMT1) também pode contribuir para absorção de cobre em mamíferos, assim como o Malvolio (Mvl), único ortólogo de *D. melanogaster* para DMT1. A rota de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$  com chaperonas metalotioneína (MT), glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD1), citocromo c oxidase 17 (Cox17), chaperona superóxido dismutase (CCS) e proteína antioxidante humana 1 (Atox1) segue uma notável semelhança entre mamíferos e *D. melanogaster*. Permanece incerto se, em *D. melanogaster*, os transportadores Cu-ATPases tipo P (ATP7) retornam à rede trans-Golgi (TGN) após o transporte de cobre para a membrana basolateral, completando um ciclo como ocorre em humanos. Fonte: SOUTHON et al., 2013.

*D. melanogaster* também possui muitos processos celulares e moleculares de desenvolvimento e função neuronal que são amplamente conservados em mamíferos (HIRF, 2010; MCGURK et al., 2015). O sequenciamento de seu genoma revelou a homologia entre cinco dos seis genes relacionados à Doença de Parkinson com humanos (WHITWORTH et al., 2006), mostrando que o sistema dopaminérgico presente na *D. melanogaster* está associado ao controle locomotor, assim como ocorre em humanos. ARCAYA et al (2014) mostrou que a suplementação de *D. melanogaster* com o metal  $\text{Cu}^{2+}$  está relacionada a uma diminuição da viabilidade neuronal e deficit da atividade motora espontânea no estágio tardio da intoxicação, associadas ao dano no sistema de neurotransmissão dopaminérgico. Também foi demonstrado, por JOAB et al (2014), que a expressão aumentada dos genes de captação de cobre, Ctr1A e Ctr1B, e gene ATP7, em combinação com níveis elevados de cobre na dieta, estão associados a um acúmulo de  $\text{Cu}^{2+}$  no SNC, resultando em um efeito prejudicial na função neuronal de *D.*

*melanogaster*. Sendo assim, *D. melanogaster* tem-se mostrado um bom organismo modelo para o estudo de disfunções relacionadas com o acúmulo de  $\text{Cu}^{2+}$ , bem como em doenças neurodegenerativas potencialmente associadas ao excesso deste metal, como doença de Alzheimer, Parkinson, Doença de Prion e esclerose lateral amiotrófica (HWANG et al., 2014, DUSEK et al., 2015). Desta forma, este modelo pode auxiliar na investigação de possíveis agentes farmacológicos que possam vir a atuar como terapia no tratamento de doenças associadas ao excesso de  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Os efeitos tóxicos da sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , induzem durante sua origem e/ou progressão eventos oxidativos, os quais são, em parte, responsáveis pelas principais danos moleculares que ocorrem a nível celular. Sendo assim, é de vital importância a realização de estudos que investiguem a ação antioxidante de compostos naturais que possam exibir propriedades protetoras contra a toxicidade destes metais. Além disso, o uso da maioria das plantas na medicina tradicional é ainda empírico, fato que marca de forma significativa a importância da realização de pesquisas para aumentar o conhecimento científico sobre as propriedades toxicológicas e/ou farmacológicas das espécies popularmente usadas.

Neste sentido, este trabalho visa buscar uma forma de tratamento que possa atenuar os efeitos deletérios causados pela toxicidade de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ; através da investigação das possíveis propriedades farmacológicas oriundas do uso do extrato da planta *P. boldus*. Para isto, foi avaliado o possível efeito de *P. boldus* sobre a toxicidade induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  em mitocôndrias hepáticas, e contra alterações bioquímicas e moleculares induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  em *D. melanogaster*. O modelo experimental *D. melanogaster* foi escolhido para este estudo devido à presença de proteínas transportadoras de  $\text{Cu}^{2+}$  altamente conservadas em mamíferos (SOUTHON et al., 2013). Assim, esperamos que a execução deste estudo possa contribuir de forma significativa na descoberta de terapias que sejam de fácil obtenção, não causem toxicidade e que possam ser promissoras em termos de farmacologia geral.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo geral

Investigar o possível efeito protetor do extrato aquoso das folhas de *Peumus boldus* sobre a toxicidade induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  em mitocôndrias hepáticas, bem como avaliar o efeito desta planta sobre alterações bioquímicas, moleculares e comportamentais induzidas por cobre em *Drosophila melanogaster*.

### 1.7.2 Objetivos específicos

- Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e expostas ao  $\text{Fe}^{2+}$ , investigar os efeitos (*in vitro*) de *P. boldus* sobre o inchaço mitocondrial, produção de EROs e de TBARS.
- Em *D. melanogaster* expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$ , investigar os efeitos de *P. boldus* sobre:
  - Percentagem de sobrevivência e alterações motoras
  - Atividade das enzimas glutationa-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE)
  - Expressão de genes envolvidos com a homeostase de  $\text{Cu}^{2+}$  e com regulação redox
  - Os níveis de  $\text{Cu}^{2+}$  acumulado em *D. melanogaster* após a exposição a este metal.
- Determinar, através de ensaios não biológicos:
  - A quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) de *P. boldus*,
  - O efeito de *P. boldus* e boldina contra a oxidação da desoxirribose induzida por  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,
  - Poder redutor do extrato de *P. boldus* e boldina em converter o ferricianeto de potássio ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em ferrocianeto de potássio ( $\text{Fe}^{2+}$ ),
  - Atividade antioxidante de *P. boldus* e boldina através da capacidade scavenger de radical DPPH•,
  - Capacidade de formação de complexos (quelatos) de *P. boldus* e boldina com o  $\text{Fe}^{2+}$ .

## 2 RESULTADOS

**2.1 Artigo 1:** “Atividade antioxidante do extrato de *Peumus boldus* e alcaloide boldina frente ao dano induzido por Fe(II)–citrate em mitocôndria de fígado de rato *in vitro*”.

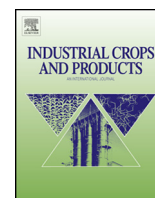
### ARTIGO 1

Industrial Crops and Products 54 (2014) 240–247  
DOI 10.1016/j.indcrop.2013.11.051

**Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)–citrate in rat liver mitochondria *in vitro***

Cláudia Vargas Klimaczewski, Rogério de Aquino Saraiva, Daniel Henrique Roos, Aline Boligon, Margareth Linde Athayde, Jean Paul Kamdem, Nilda Vargas Barbosa, João Batista Teixeira Rocha.





## Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)–citrate in rat liver mitochondria *in vitro*



Cláudia Vargas Klimaczewski<sup>a</sup>, Rogério de Aquino Saraiva<sup>d</sup>, Daniel Henrique Roos<sup>a</sup>, Aline Boligon<sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>b</sup>, Jean Paul Kamdem<sup>a,c</sup>, Nilda Vargas Barbosa<sup>a,\*</sup>, João Batista Teixeira Rocha<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular and Program of Post-Graduation in Biological Sciences-Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup> Program of Post-Graduation Pharmaceutical Science, Federal University of Santa Maria, Campus Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

<sup>d</sup> Academic Unit of Serra Talhada, Federal Rural University of Pernambuco, Serra Talhada, PE CEP 56903-000, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 September 2013

Received in revised form

26 November 2013

Accepted 29 November 2013

Available online 3 March 2014

#### Keywords:

Antioxidants

*Peumus boldus*

Boldine

Mitochondria

### ABSTRACT

*Peumus boldus* is a medicinal plant used in the treatment of liver diseases. Chronic liver disease can be associated with oxidative stress and iron overload. The aim of this study was to evaluate the effects of *P. boldus* leaf extract and boldine against Fe<sup>2+</sup>–citrate induced mitochondrial oxidative damage systems. *P. boldus* was more efficient antioxidant than boldine, when mitochondria were used (hepatic mitochondrial swelling, DFCH oxidation and lipid peroxidation). *P. boldus* (100 µg/mL) inhibited Fenton reaction by 94% and chelated about 70% of Fe<sup>2+</sup>. Boldine (3.27 µg/mL) exhibited a higher reducing power (447%) and scavenged more efficiently DPPH• than *P. boldus* 100 µg/mL (44.7% vs 60.7%, respectively). The antioxidant effects of *P. boldus* extract (PbE) can be attributed to its polyphenolic compounds, determined by HPLC. Thus PbE and boldine can have synergic antioxidant properties and contribute to the protective effect of *P. boldus* against liver diseases associated with oxidative stress and free iron.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae) leaves have been worldwide used in folk medicine for the treatment of liver complaints (Speisky and Cassels, 1994; Simirgiotis and Schmeda-Hirschmann, 2010; Soto et al., 2013). Boldo infusion has several active components that can be involved in its pharmacological effects, including alkaloids, flavonoids and essential oils (Fuente et al., 2005). However, the constituent(s) involved in hepatoprotective effects of *P. boldus* are not well defined.

Oxidative stress has been implicated in the installation and progression of a myriad of chronic degenerative disorders (Beal, 1998; Poli, 2000). Liver and related diseases can be associated with disturbance of iron homeostasis, which can be associated with mitochondrial oxidative stress via stimulation of Fenton-like reaction (Scheme 1; Fato et al., 2008; Lenaz, 2002). The

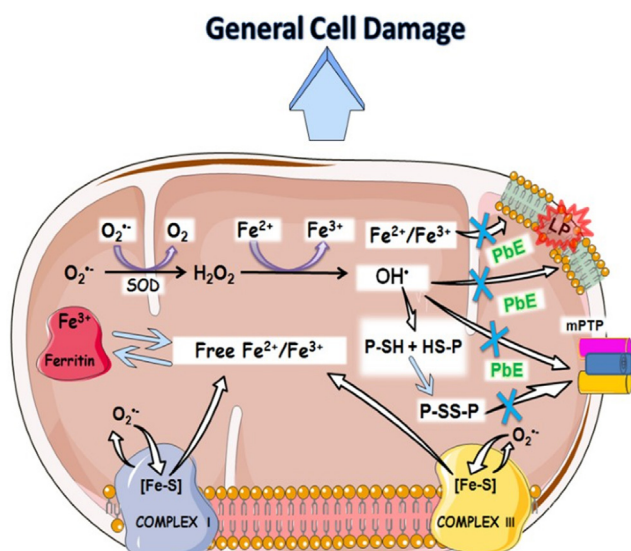
pro-oxidant mitochondrial environment can elicit changes in intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) and disrupt mitochondrial electron transport chain (mtETC) and induce mitochondrial permeability transition pore opening (Hershko et al., 1998).

Consequently, pharmacological agents or preparations from medicinal plants that modulate negatively both the iron-dependent and independent stimulation of oxidative stress can be an adjuvant strategy in the management of liver diseases (Pithayanukul et al., 2009). Of particular therapeutic significance, boldo leaf extracts and boldine (one of its major components) have been shown to exhibit antioxidant activity in different *in vitro* and *in vivo* models (Jiménez et al., 2000; Jang et al., 2000; Schmeda-Hirschmann et al., 2003; Zielinski et al., 2013; Soto et al., 2013).

However, to the best of our knowledge, the modulation of oxidative stress in isolated liver mitochondria by aqueous extracts of *P. boldus* has not been yet conducted. Consequently, our study was performed to investigate the ability of *P. boldus* aqueous extract and its typical alkaloid boldine in reducing the oxidative damage induced by Fe<sup>2+</sup>/citrate in liver mitochondria of rats.

\* Corresponding authors. Tel.: +55 55 3220 814.

E-mail addresses: [nvbarbosa@yahoo.com](mailto:nvbarbosa@yahoo.com) (N.V. Barbosa), [jbtrocha@yahoo.com.br](mailto:jbtrocha@yahoo.com.br), [jbtrocha@gmail.com](mailto:jbtrocha@gmail.com) (J.B.T. Rocha).



**Scheme 1.** Protective effect of *Peumus boldus* extract (PbE) against iron-induced mitochondria oxidative stress.

## 2. Procedure

### 2.1. Chemicals

Succinic acid, deoxyribose, orto-phenanthroline, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma (USA) and iron sulphate ( $\text{FeSO}_4$ ) from Reagen (Brazil). Methanol, acetic acid, caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin, kaempferol, boldine and catechin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

### 2.2. Animals

Adult male *Wistar* rats from our own breeding colony (250–350 g) were maintained in continuous access to food and water in a room controlled temperature ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. Animals were handled and treated according to the guidelines set forth by the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### 2.3. Preparation of infusion

The infusion was made by pouring 10 mL of boiling water on 0.9 g of plant material. The mixture was left to stand for 20 min and filtered. The infusion was freshly prepared for each experiment.

### 2.4. Quantification of phenolics and flavonoids compounds by HPLC-DAD

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C18 column ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ), and the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B). Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 280 nm for catechin, 302 nm for boldine, 325 nm for caffeic acid, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The chromatography peaks were confirmed by

**Table 1**  
Composition of buffers to mitochondrial assay.

Buffer	Composition
I	Manitol 225 mM, sucrose 75 mM, $\text{K}^+$ EGTA 1 mM, bovine serum albumin (BSA) 0.1% and HEPES 10 mM (pH 7.2) (KOH)
II	Manitol 225 mM, sucrose 75 mM, $\text{K}^+$ EGTA 1 mM and $\text{K}^+$ -HEPES 10 mM pH 7.2
III	Sucrose 100 mM, KCl 65 mM, $\text{K}^+$ -HEPES 10 mM and EGTA 50 $\mu\text{M}$ pH 7.2

comparing their retention time and Diode-Array-UV spectra with those of the reference standards (Boligon et al., 2012; Ozturk et al., 2009).

### 2.5. Mitochondrial preparation

Mitochondria were isolated from liver of rat according to Brustovetsky and Dubinsky (2000) with some modifications. The livers were homogenized in isolation buffer I (Table 1) and the homogenate was centrifuged at  $2000 \times g$  for 7 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The pellet was re-suspended in buffer II (Table 1) and re-centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Then, the last mitochondrial pellet was re-suspended in buffer III. The experiments were performed in buffer III, using 5 mM succinate as respiratory substrate.

### 2.6. Mitochondrial membrane lipid peroxidation (LPO) assay

The mitochondrial suspension (1.5 mg/mL) was incubated with 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  plus 2 mM sodium citrate at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min in the presence or absence of *P. boldus* extract or boldine. LPO was determined according Ohkawa et al. (1979). The absorbance of MDA-TBA complex was measured at 535 nm. The values are expressed in nmol MDA/mg of mitochondrial protein.

### 2.7. Mitochondrial swelling

Measurement of mitochondrial swelling was performed at 600 nm (slit 1.5 nm) for both excitation and emission wavelengths (Puntel et al., 2010) using a RF-5301 Shimadzu spectrofluorimeter (Kyoto, Japan). Mitochondria (0.1 mg protein) were added to 3 mL standard incubation buffer III. The mitochondrial swelling was induced by 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ -2 mM citrate with or without extract at 25, 50 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *P. boldus* or boldine (0.16, 0.32, 1.63 or 3.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The results shown are the mean of four independent experiments, using different mitochondrial preparations.

### 2.8. Estimation of reactive oxygen species (ROS) production

ROS production in the mitochondria isolated from rat liver was estimated with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). Fluorescence of DCF was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission, with slit widths of 1.5 nm (Hempel et al., 1999). The mitochondria (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in buffer III were supplemented with 5 mM of succinate and 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are the mean of four independent experiments.

### 2.9. Protein determination

The protein content was performed according to Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard.

### 2.10. DPPH• scavenging activity

The antioxidant activity of the extract and alkaloid boldine was evaluated by monitoring their ability in quenching the stable free radical DPPH (Choi et al., 2002). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical; 85  $\mu$ M) was added to a medium containing *P. boldus* leaf extract (25, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ g/mL), boldine (0.16, 0.32, 1.63, 3.27, 32.2, 49.1, 65.4, and 81.8  $\mu$ g/mL) or EtOH and the mixture was incubated for 25 min at room temperature. Four different concentrations of ascorbic acid (0.88, 1.76, 3.52, 7.04, and 14.08  $\mu$ g/mL) was used as a positive control. The decrease in the absorbance was measured at 540 nm using Elisa microplate readers, and DPPH• scavenging activity was expressed as the inhibition percentage of free radical.

### 2.11. Determination of Fe<sup>2+</sup> by ortho-phenanthroline

Solutions of iron sulfate were freshly prepared just before use. FeSO<sub>4</sub> (to a final concentration of 120  $\mu$ M) was added to tubes containing 0.9% saline, 0.1 M Tris–HCl, pH 7.5 and *P. boldus* extract (0, 25, 50 or 100  $\mu$ g/mL) or boldine (32.2  $\mu$ g/mL). After incubation for 10 min at 37 °C,  $\theta$ -phenanthroline (final concentration of 0.25%) was added and the color of the Fe<sup>2+</sup>-phenanthroline complex was determined at 510 nm. Fe<sup>2+</sup> could be either chelated by *P. boldus* or boldine or it could be oxidized to Fe<sup>3+</sup>. Then, to determine the extent of Fe<sup>2+</sup> oxidation in the presence of *P. boldus* or boldine, ascorbic acid (to final concentration of 4 mM) were added and the color was again determined at 5, 10, 15 and 20 min after addition of ascorbic acid.

### 2.12. Reducing power

Substances that have reducing power can convert potassium ferricyanide (Fe<sup>3+</sup>) to ferrocyanide (Fe<sup>2+</sup>). Here we determined the reducing power of *P. boldus* extract and boldine. *P. boldus* extract (25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) or boldine (0.16, 0.32, 1.63, 3.27, 32.2, and 49.1  $\mu$ g/mL) were added to in a medium containing 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 1% potassium ferricyanide (final volume of 1.5 mL). Tubes were incubated at 50 °C in water bath for 20 min. Then, a solution of 10% trichloroacetic acid (0.625 mL) was added. Tubes were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and 0.625 mL of the upper layer was mixed with distilled water (0.625 mL) and 0.25 mL of 0.1% FeCl<sub>3</sub> solution. The absorbance was measured at 700 nm (Mathew and Abraham, 2006). Ascorbic acid at various concentrations was used as standard.

### 2.13. Determination of oxidative damage to deoxyribose

The oxidative damage to deoxyribose was determined according the method described by Halliwell et al. (1987). Briefly, Fenton reaction was induced by mixing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub>. The reaction media, contained the *P. boldus* extract or boldine (as indicated in Fig. 5), 3 mM deoxyribose, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 50  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> and/or 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Solutions of FeSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were made prior to use. Reaction mixtures were incubated at 37 °C for 30 min and stopped by the addition of 0.8 mL of trichloroacetic acid (TCA) 2.8%. Then 0.4 mL of thiobarbituric acid (TBA) 0.6% was added and the tubes were incubated at 100 °C for 20 min. Color was recorded at 532 nm.

### 2.14. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. Results were considered statistically different when  $p < 0.05$ . The effects of *P. boldus* and boldine in mitochondrial swelling were compared to

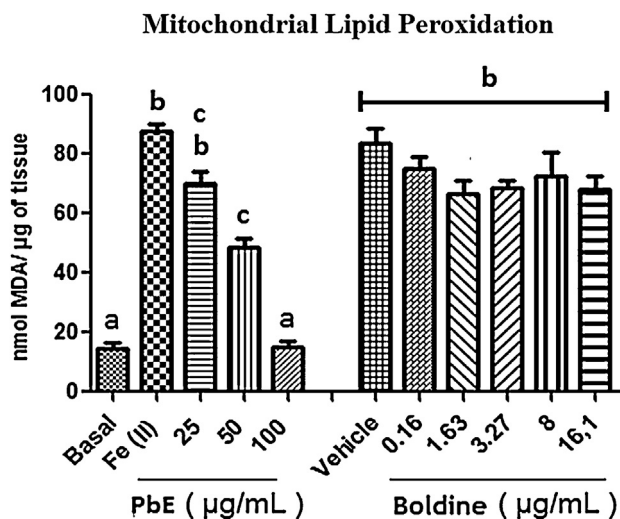


Fig. 1. *P. boldus* extract blunts Fe<sup>2+</sup>-induced mitochondrial membrane lipid peroxidation more effectively than boldine. The lipid peroxidation was stimulated by Fe<sup>2+</sup>-citrate in isolated rat liver mitochondria. All experiments were performed in duplicate ( $n = 4$ ).

Fe<sup>2+</sup>-induced by Two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Effect of *P. boldus* and boldine in hepatic mitochondrial iron-induced lipid peroxidation

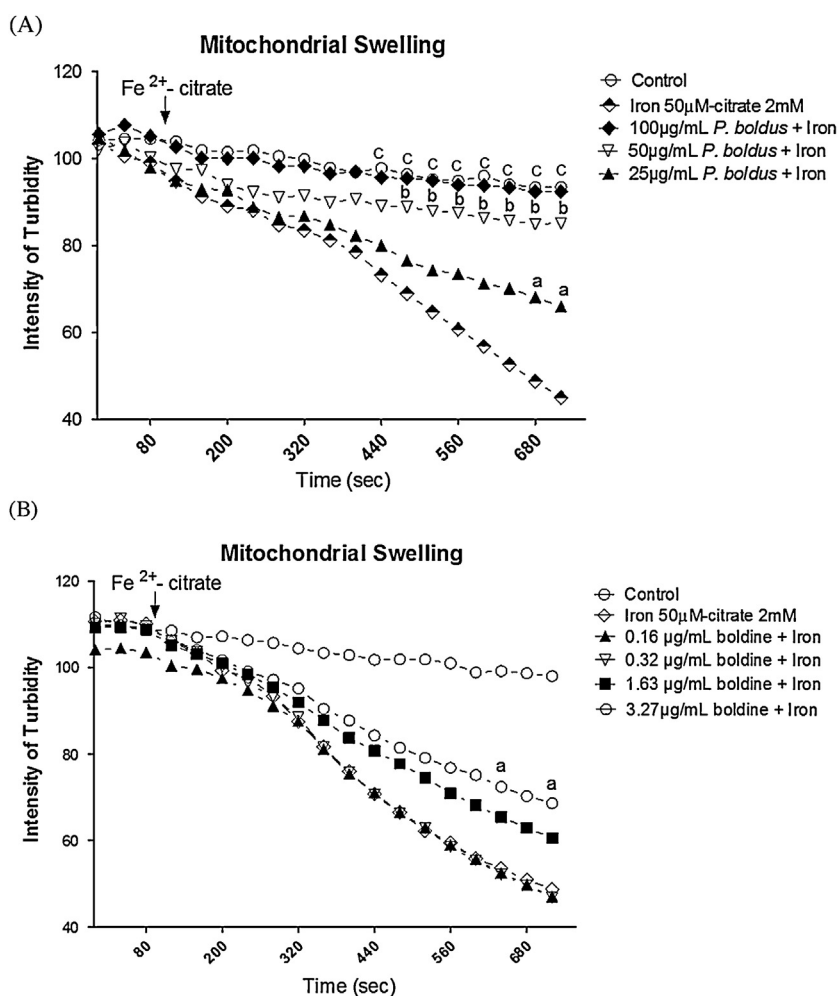
Fe<sup>2+</sup>-citrate induced a marked increase in lipid peroxidation in liver mitochondria (Fig. 1) and *P. boldus* extract (PbE) inhibited lipid peroxidation in a concentration-dependent manner. At 100  $\mu$ g/mL, PbE completely blunted Fe<sup>2+</sup>-citrate induced lipid peroxidation ( $p < 0.05$ ). In contrast, boldine was not effective as inhibitor of Fe<sup>2+</sup>-citrate induced lipid peroxidation in liver mitochondria of rats (Fig. 1).

### 3.2. Effect of *P. boldus* extract and boldine in iron-induced mitochondrial swelling

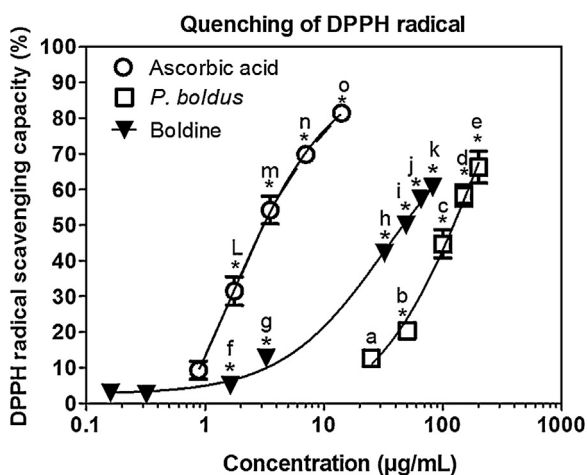
The mitochondrial swelling, which indicates the influx of osmolytes associated with a nonspecific increase in mitochondrial membrane permeability (Hermes-Lima et al., 1995) was used to determine the protective effects of *P. boldus* extract and boldine in iron-induced mitochondria damage. Fig. 2 shows that Fe<sup>2+</sup>-citrate induced a marked swelling of hepatic mitochondria, which was quantified by a decrease in absorbance determined at 600 nm. Mitochondrial swelling was blunted by aqueous extract of *P. boldus* in a concentration-dependent manner, with a maximum effect observed at 100  $\mu$ g/mL of PbE (Fig. 2A). In contrast, boldine at the highest concentration tested (3.27  $\mu$ g/mL) caused only a partial inhibition of mitochondrial swelling (Fig. 2B). This concentration of boldine corresponds to the alkaloid levels found in the highest concentration of aqueous extract tested (100  $\mu$ g/mL; Table 1). In the absence of Fe<sup>2+</sup>-citrate, PbE or boldine did not modify mitochondrial swelling (data not shown;  $p > 0.10$ ).

### 3.3. *P. boldus* extract and boldine DPPH• scavenging activity

*P. boldus* and boldine quenched DPPH• radical in a concentration dependent-manner (Fig. 3). *P. boldus* quenched 58.3% of DPPH• radical at 100  $\mu$ g/mL, while boldine, at 3.27  $\mu$ g/mL (which corresponds



**Fig. 2.** *P. boldus* extract blunts  $\text{Fe}^{2+}$ -induced mitochondrial swelling more effectively than boldine. Results are expressed as mean of four determinations. Mean that does not share the same letters in the same line are significantly different (Bonferroni test at  $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** DPPH<sup>•</sup> scavenging activity of *P. boldus* extract or boldine. After 30 min of incubation with DPPH<sup>•</sup> (85 µM), the absorbance was determined at 540 nm. Results are expressed as percent of inhibition in relation to control  $\pm$  SEM. Ethanol was not different from control in all experiments and is not represented. Different letters indicate differences among the different concentrations of the same preparation or compounds and (\*) indicates statistical difference from control by one-way ANOVA.

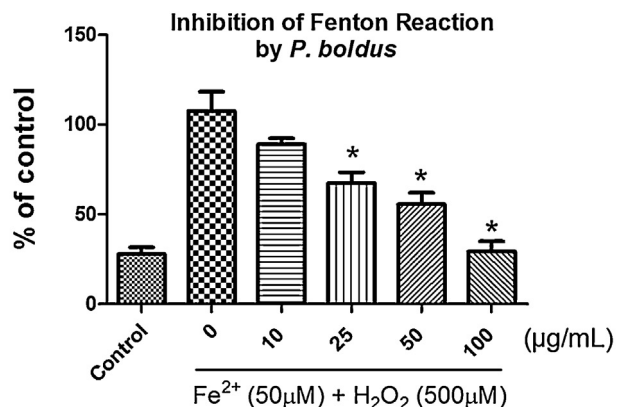
to the concentration found in 100 µg/mL of *P. boldus* crude extract) quenched only 12.7% of DPPH<sup>•</sup> radical color.

### 3.4. *P. boldus* partially inhibits $\text{Fe}^{3+}$ reduction by ascorbate

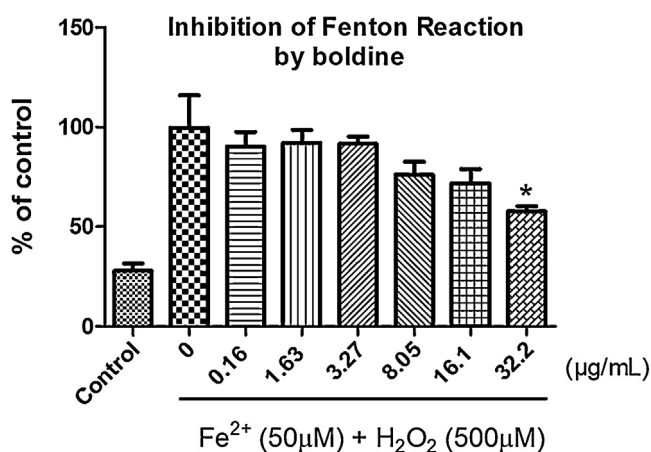
$\theta$ -Phenanthroline forms a red-orange complex with  $\text{Fe}^{2+}$  that can be detected at 510 nm. PbE caused a decrease in the color at 510 nm, indicating that it can either chelate  $\text{Fe}^{2+}$  or accelerate  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation to  $\text{Fe}^{3+}$ . To assess whether the decrease in the absorbance in the presence of PbE caused by chelation or oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ , ascorbic acid was added to the reaction medium to reduce  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$ . Ascorbic acid caused a partial increase in absorbance, indicating that *P. boldus* stimulated the oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ . Also, some components of the crude extract formed a stable complex with  $\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 4A). In contrast, boldine did not chelate or oxidize  $\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 4B), indicating that boldine was not the involved in the chelation or oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  observed in the presence of PbE (Fig. 4A).

### 3.5. Hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) radical scavenging activity

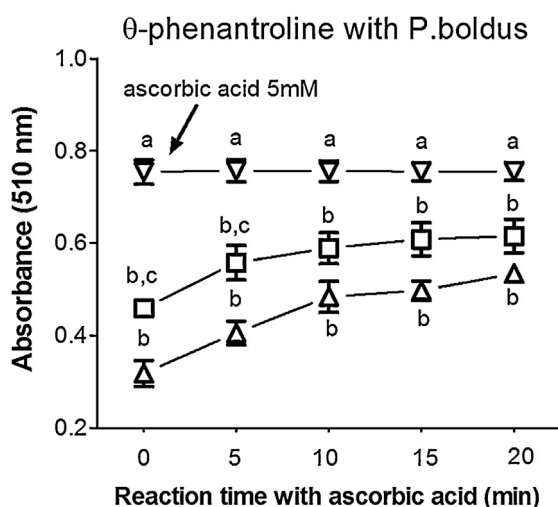
Hydroxyl radicals generated by Fenton reaction stimulate deoxyribose oxidative degradation and increase MDA formation (Halliwell et al., 1987). *P. boldus* extract exhibited concentration-dependent free radical-scavenging activity against oxidative damage induced by  $\text{Fe}(\text{II})$  (50 µM) plus ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (100 µM) (Fig. 5). Boldine up to 16.1 µg/mL did not inhibit deoxyribose degradation

(A) Inhibition of fenton reaction by *P. boldus*

## (B) Inhibition of fenton reaction by Boldine



**Fig. 4.** Effects of *P. boldus* extract and boldine against Fenton reaction-induced deoxyribose degradation. (\*) indicates statistical difference from  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$  and (#) indicates statistical difference among the different concentrations. All experiments were performed in duplicate. Results are representative of three experiments.



**Fig. 5.** *P. boldus* partially inhibits  $\text{Fe}^{3+}$  reduction by ascorbate in the absence of rat liver mitochondria. Ascorbate (4 mM) was added where indicated by the arrow. (a) 120 µM  $\text{Fe}^{2+}$ ; (b) 25 µg/mL *P. boldus*; (c) 50 µg/mL *P. boldus*; (d) 100 µg/mL *P. boldus*; (e) 32.2 µg/mL boldine. Values are the average of four determinations. (#, \$) indicates statistical difference among the different concentrations and (\*) indicates statistical difference from  $\text{Fe}^{2+}$  (line "a"). All experiments were performed in duplicate ( $n=4$ ).

**Table 2**Phenolics and flavonoids composition of *P. boldus*.

Compounds (µg/mL)	100 µg/mL <i>P. boldus</i>	50 µg/mL <i>P. boldus</i>	25 µg/mL <i>P. boldus</i>
Catechin	3.37	1.68	0.84
Boldine	3.27	1.63	0.81
Caffeic acid	6.25	3.12	1.56
Rutin	3.49	1.74	0.87
Quercitrin <sup>a</sup>	7.51	3.75	1.87
Quercetin	8.70	4.35	2.17
Kaempferol	7.82	3.91	1.95

<sup>a</sup> Quantified as quercetin. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three determinations.

(Fig. 5); whereas 32.2 µg/mL of boldine (which is ten times the quantity found in 100 µg/mL of PbE) caused only a modest inhibition of deoxyribose degradation (Fig. 5).

## 3.6. Determination of reactive oxygen species (ROS)

The mitochondrial generation of ROS was determined using the membrane permeable fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ).  $\text{Fe}^{2+}$ -citrate caused a marked increase in DFCH oxidation and PbE decreased DFCH oxidation in a concentration-dependent manner (Fig. 6A). However, boldine caused only a partial decrease in DFCH oxidation, when tested at 3.27 µg/mL, which is equivalent to its concentration found in 100 µg/mL of PbE (Fig. 6B).

## 3.7. Reducing power

Fig. 7 shows that the reducing power of *P. boldus*, boldine and the ascorbic acid (positive control) increased in concentration-dependent manner. These results indicate that both *P. boldus* and boldine can donate electrons to ferricyanide and, hypothetically, react with free radicals, converting them to more stable products.

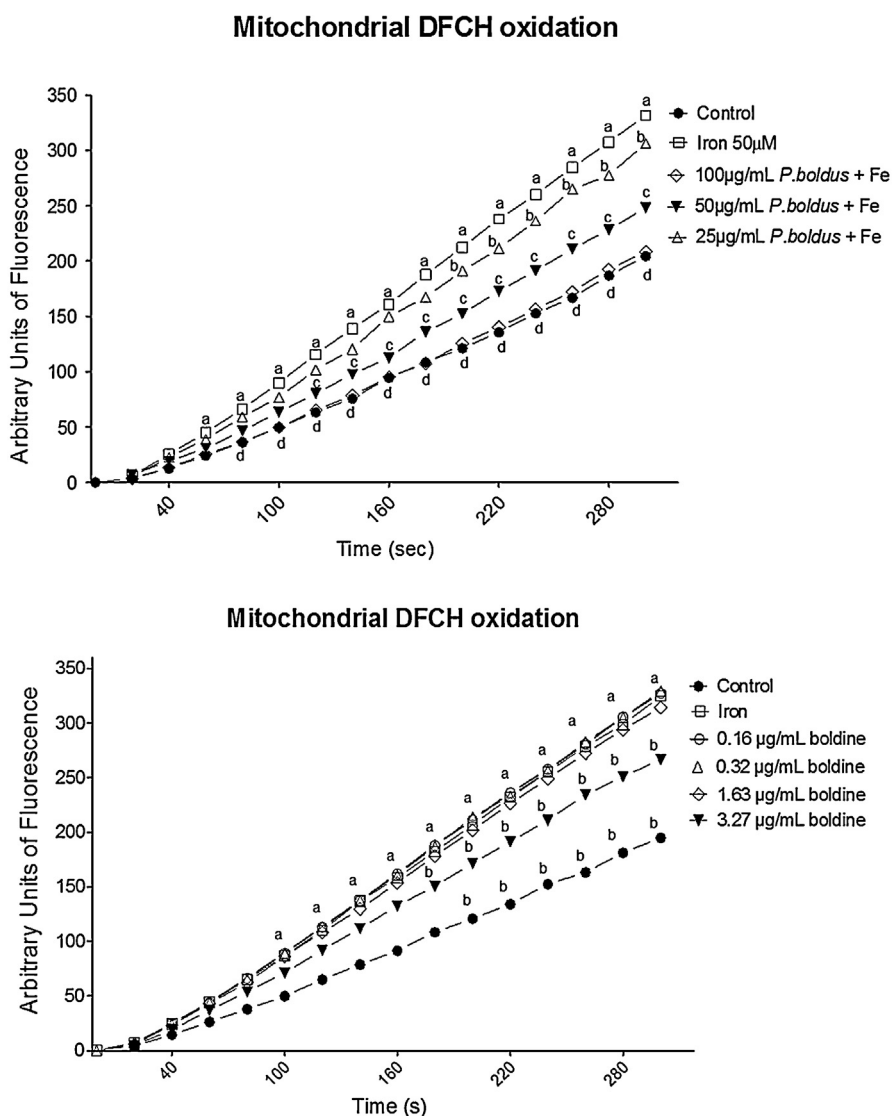
## 3.8. Polyphenolic compounds quantification

Aqueous extract from leaves of *P. boldus* presented the following polyphenols: catechin (retention time-RT 14.82 min, peak 1), boldine (RT 21.94 min, peak 2), caffeic acid (RT 29.05 min, peak 3), rutin (RT 35.62 min, peak 4), quercitrin (RT 43.09 min, peak 5) quercetin (RT 48.24 min, peak 6) and kaempferol (RT 56.13 min, peak 7) (Table 2).

## 4. Discussion

Aqueous extracts of *P. boldus* have been used in folk medicine for the treatment of liver ailments. The therapeutic properties of crude extracts of *P. boldus* have been suggested to be associated with the presence of polyphenolic compounds, mainly to the alkaloid boldine (Speisky et al., 1991; Falé et al., 2012). Accordingly, literature has indicated that boldine and crude extracts from *P. boldus* have antioxidant properties in different *in vivo* and *in vitro* models of toxicity (Schmeda-Hirschmann et al., 2003; O'Brien et al., 2006; Falé et al., 2012; Lau et al., 2013a,b). However, our understanding about the pharmacological properties of *P. boldus* is still elusive. Most importantly, the role of modulation of iron-induced mitochondrial hepatotoxicity by *P. boldus* has not yet been explored by the literature.

Liver is an important organ in iron metabolism (Deugnier et al., 2008) and mitochondria are one of the most important intracellular site of iron metabolism (Fato et al., 2008). Indeed, mitochondria require iron for its own proper physiological function (e.g., Fe-S cluster of respiratory chain complexes I and III) (Lill et al., 2012)



**Fig. 6.** Antioxidant activity of *P. boldus* extract and boldine against Fe(II)-induced mitochondrial DFCH oxidation. ROS generation were estimated using the fluorophore 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Results are expressed as fluorescence intensity  $\pm$  SEM. (a)–(c) indicate statistical difference among the different concentrations of the extract ( $p < 0.05$ ).

and for cellular heme synthesis (Nilsen and Romslo, 1984; Shayeghi et al., 2005). If not bound to its trafficking or storage proteins, iron is an extremely toxic metal. As indicated in Scheme 1, the free  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  can start mitochondrial oxidative stress via interaction with different reactive oxygen species (ROS). In addition,  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  can also directly induce ROS production and/or lipid peroxidation (LPO) (Farina et al., 2013). Free radicals, particularly, the extremely reactive hydroxyl radical ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) can oxidize thiol groups from proteins and form high-molecular weight protein aggregates (i.e., precursors of mitochondrial permeability transition pore, mPTP). Iron can also be released from mitochondrial iron–sulfur clusters found in complexes I and III after interacting with ROS, for instance,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Mitochondrial free iron can be buffered by a mitochondrial ferritin (Minotti and Aust, 1989; Farina et al., 2013). In liver, the combination of these factors (elevated iron burden and aerobic metabolism) renders hepatic mitochondrial a critical target to reactive oxygen species and iron (Koskenkorva-Frank et al., 2013) (Scheme 1).

Here we have demonstrated that iron can induce mitochondrial dysfunction and aqueous extract of *P. boldus* blunted iron toxicity

(Scheme 1). PBE efficiently blunted iron-induced mitochondrial swelling, oxidative stress and LPO (Figs. 1, 2A and 6A).

In contrast to crude extracts, boldine exhibited only a modest effect on iron-induced mitochondrial dysfunction (Figs. 1, 2B and 6B). Therefore, we can presume that other components from *P. boldus* are most critical for the pharmacological hepatoprotective effects than boldine in liver mitochondrial damage induced by iron.

In fact, the molecular mechanisms involved in mitochondrial protection by *P. boldus* crude extract can be attributed primarily to iron chelation and formation of redox inactive iron-complexes with *P. boldus* constituents (Fig. 4A). In fact, polyphenol constituents of *P. boldus* (for instance, catechin) chelates iron and have antioxidant properties (Pereira et al., 2009). Thus, *P. boldus* inhibition of iron mediated Fenton chemistry (Fig. 5A) and LPO (Fig. 1) were most likely a consequence of iron chelation and formation of inactive complexes of iron with plant polyphenols. In order to get more insight into the mechanism(s) of the protective effect of PBE, its ability to scavenge  $\text{DPPH}^{\bullet}$  (Fig. 3) and its hydrogen donating potential (Fig. 7) were evaluated. These assays demonstrated that

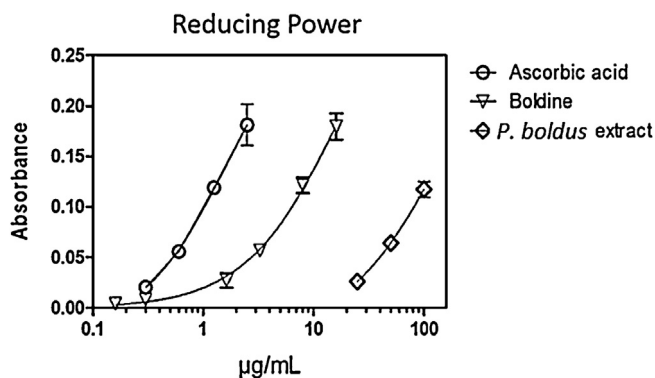


Fig. 7. Reductive ability of *P. boldus* and boldine vs ascorbic acid. Values expressed in absorbance are the mean  $\pm$  SEM of four duplicates.

hydrogen donation to the free radical and its conversion to non-reactive specie can be a mechanism by which the extract decrease the concentration of the reactive species (Zielinski et al., 2013).

Thus, our results show, for the first time, that PbE can blunt oxidative stress *via* different molecular mechanisms, *i.e.*, it can react with free radicals or can chelate free iron and possibly maintain it in a non-redox active state.

Boldine, which did not significantly chelate iron (data not shown) exhibited only a modest effect on lipid peroxidation (Fig. 1) and Fenton reaction (Fig. 5B). In contrast, boldine was a better reducing agent (Fig. 7) and scavenger of DPPH\* (Fig. 3) than *P. boldus* extracts. Therefore, it is possible to conclude that the small effect of boldine in mitochondria can be linked to its well known antioxidant capacity (Jang et al., 2000; Lau et al., 2012). However, here we described for the first time that the main protection mechanism of PbE against mitochondrial oxidative damage induced by Fe<sup>2+</sup>-citrate is the iron chelation, and the effect for the boldo leaf infusion is associated with synergic effect of several flavonoids and phenolic compounds from the extract (Table 2). In isolation, boldine has a little contribution in the protective effect of the extract against oxidative damage induced by pro-oxidant Fe(II)-citrate.

## 5. Conclusions

The results presented here indicate that crude aqueous extract of *P. boldus*, which is the most popular ethnopharmacological form of *P. boldus* use, exhibited important antioxidant properties against iron-induced hepatic mitochondrial dysfunction. Boldine, which is one alleged pharmacological agent found in *P. boldus* had modest activity against iron-induced mitochondrial toxicity, but was a better radical scavenger than *P. boldus* crude extract. The results presented in this paper can suggest that at least in part the hepatoprotective effects of *P. boldus* extract are mediated by reducing iron toxicity and by the radical scavenger and reducing properties of boldine. Taken together, our data indicated that *P. boldus* has multifunctional antioxidant therapeutic components (Scheme 1) that most likely work in a synergic way to protect liver from toxic insults.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

C.V.K., N.B. and J.B.T.R. were recipient of CNPq fellowship. Work supported by CNPq, CAPES, FAPERGS-PRONEX-CNPq, INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection.

## References

- Beal, M.F., 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 211–223.
- Boligon, A.A., Brum, T.F., Frolhich, J.K., Froeder, A.L.F., Athayde, M.L., 2012. HPLC/DAD profile and determination of total phenolic, flavonoids, tannins, and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research Journal of Phytochemistry* 6, 84–91.
- Brustovetsky, N., Dubinsky, J.M., 2000. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *The Journal of Neuroscience* 20, 8229–8237.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Paerk, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 53, 1161–1168.
- Deugnier, Y., Brissot, P., Loréal, O., 2008. Iron and the liver: update 2008. *Journal of Hepatology* 48, 113–123.
- Falé, P.L., Amaral, F., Amorim, M.P.J., Sousa, S.M., Florêncio, M.H., Frazão, F.N., Serralheiro, M.L., 2012. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2656–2662.
- Farina, M., Avila, D., Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International* 62, 575–594.
- Fato, R., Bergamini, C., Leoni, S., Strocchi, P., Lenaz, G., 2008. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochemical Research* 33, 2487–2501.
- Fernández, J., Lagos, P., Rivera, P., Zamorano-Ponce, E., 2009. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytotherapy Research* 23, 1024–1027.
- Fuente, J.C., Quezada, N., Valle, J.M., 2005. Solubility of boldo leaf antioxidant components (Boldine) in high-pressure carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria* 235, 196–200.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O.I., 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165, 215–219.
- Hempel, S.L., Buettner, G.R.O., Malley, Y.Q., Wessels, D.A., Flaherty, D.M., 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 146–159.
- Hermes-Lima, M., Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Vercesi, A.E., 1995. Characteristics of Fe(II) ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biochemistry* 145, 53–60.
- Hershko, C., Link, G., Cabantchik, I., 1998. Pathophysiology of iron overload. *Annals of the New York Academy of Sciences* 850, 191–201.
- Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S., Lee, C.S., 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research* 42, 361–371.
- Jiménez, I., Garrido, A., Bannach, R., Gotteland, M., Speisky, H., 2000. Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. *Phytotherapy Research* 14, 339–343.
- Koskenkorva-Frank, S., Weiss, G., Koppenol, W.H., Burckhardt, S., 2013. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 1174–1194.
- Lau, Y.S., Machha, A., Achike, F.I., Murugan, D., Mustafa, M.R., 2012. The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Experimental Biology and Medicine* 237 (1), 93–98.
- Lau, Y.S., Tian, X.Y., Huang, Y., Murugan, D., Achike, F.I., Mustafa, M.R., 2013a. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. *Biochemical Pharmacology* 85 (3), 367–375.
- Lau, Y.S., Tian, X.Y., Mustafa, M.R., Murugan, D., Liu, J., Zhang, Y., Lau, C.W., Huang, Y., 2013b. Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology* 170 (6), 1190–1198.
- Lenaz, G., 2002. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52, 159–164.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., Mühlhoff, U., 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1491–1508.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Mathew, S., Abraham, T.E., 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry* 94, 520–528.
- Minotti, G., Aust, S.D., 1989. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chemico-Biological Interactions* 71, 1–19.
- Nilsen, T., Romslo, I., 1984. Transferrin as a donor of iron to mitochondria: effect of pyrophosphate and relationship to mitochondrial metabolism and heme synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 802, 448–453.

- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., Speisky, H., 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions* 159, 1–17.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Ozturk, N., Tuncel, M., Potoglu-Erkara, I., 2009. Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* ssp. A comparative study with *H. perforatum*. *Pharmacology Biology* 47, 120–127.
- Pereira, R.P., Fachinetto, R., Prestes, A.S., Puntel, R.L., Silva, G.N., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Athayde, M.L., Bürger, M.E., Morel, A.F., Morsch, V.M., Rocha, J.B., 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research* 34, 973–983.
- Pithayanukul, P., Nithitanakool, S., Bavovada, R., 2009. Hepatoprotective potential of extracts from seeds of *Areca catechu* and nutgalls of *Quercus infectoria*. *Molecules* 14, 4987–5000.
- Poli, G., 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 21, 49–98.
- Puntel, R.L., Roos, D.H., Folmer, V., Nogueira, C.W., Galina, A., Aschner, M., Rocha, J.B., 2010. Mitochondrial dysfunction induced by different organochalcogens is mediated by thiol oxidation and is not dependent of the classical mitochondrial permeability transition pore opening. *Toxicological Sciences* 117, 133–143.
- Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 443–449.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J., McKie, A.T., 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122, 789–801.
- Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A., Theoduloz, C., Astudillo, S.L., Feresin, G.E., Tapia, A., 2003. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol (Boldo). *Free Radical Research* 37, 447–452.
- Speisky, H., Cassels, B.K., Lissi, E.A., Videla, L.A., 1991. Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Pharmacology* 41, 1575–1581.
- Speisky, H., Cassels, B.K., 1994. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research* 29, 1–12.
- Soto, C., Caballero, E., Perez, E., Zuniga, M.E., 2013. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.002>.
- Zielinski, A.A.F., Haminiuk, C.W.I., Alberti, A., Nogueira, A., Demiate, I.M., Granato, D., 2013. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>.



**2.2 Artigo 2:** “*Peumus boldus* atenua a toxicidade induzida pelo cobre em *Drosophila melanogaster*”.

## **ARTIGO 2**

Biomedicine & Pharmacotherapy 97 (2018) 1–8  
DOI 10.1016/j.biopha.2017.09.130

***Peumus boldus* attenuates copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster***

Cláudia Vargas Klimaczewski, Assis Ecker, Bruna Piccoli, Michael Aschner,  
Nilda Vargas Barbosa, João Batista Teixeira Rocha.



## Original article

*Peumus boldus* attenuates copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*Cláudia Vargas Klimaczewski<sup>a</sup>, Assis Ecker<sup>a</sup>, Bruna Piccoli<sup>a</sup>, Michael Aschner<sup>b</sup>,  
Nilda Vargas Barbosa<sup>a</sup>, João Batista Teixeira Rocha<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Copper  
*Drosophila melanogaster*  
*Peumus boldus*  
Oxidative stress

## ABSTRACT

*Peumus boldus* (*P. boldus*) is a medicinal plant popularly used in the treatment of gastrointestinal disorders. *P. boldus* aqueous extract is rich in phenolic compounds and alkaloids that possess antiinflammatory and antioxidant effects. In the present study, the potential protective effect of *P. boldus* against Cu<sup>2+</sup>-induced toxicity was investigated. Adult *Drosophila melanogaster* were exposed to Cu<sup>2+</sup> (1 mM and 3 mM) and/or *P. boldus* aqueous extract (5 mg/mL) in the food during 4 days. Cu<sup>2+</sup>-fed flies had impairment in the negative geotaxis performance (i.e. motor climbing capability) as well as a higher incidence of mortality when compared to the control group. *P. boldus* co-treatment afforded protection against the Cu<sup>2+</sup>-induced toxicity. Acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activity decreased significantly in *D. melanogaster* after Cu<sup>2+</sup> exposure. *P. boldus* co-exposure for 4 days restored enzyme activities to control levels. In addition, Cu<sup>2+</sup> exposure caused a significant increase in the mRNA levels of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (Sod1), catalase (Cat), thioredoxin reductase (TrxR1) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), as well as increased the mRNA levels of acetylcholinesterase (Ace). The expression of P-type ATPase (Atp7A) and copper uptake protein 1 (Ctr1A) mRNAs were up-regulated in *D. melanogaster* exposed to Cu<sup>2+</sup>. The co-treatment with *P. boldus* blunted Cu<sup>2+</sup>-induced up-regulation of Atp7A and down-regulated Ctr1A mRNA expression. These findings suggest that *P. boldus* extracts reduce Cu<sup>2+</sup>-induced toxicity but not Cu<sup>2+</sup> absorption in *D. melanogaster*. Consequently, *P. boldus* can be a potential therapeutic alternative for modulating Cu<sup>2+</sup>-associated toxicity.

## 1. Introduction

Copper (Cu<sup>2+</sup>) is a redox active trace metal essential for life as a component of numerous cupro-enzymes, such as cytochrome-c oxidase (energy production), tyrosinase (pigmentation), superoxide dismutase 1 (antioxidant defense) and lysyl oxidase (connective tissue formation), to name a few. However, excess of labile or free Cu<sup>2+</sup> (serum non-ceruloplasmin bound copper) is cytotoxic and may produce highly damaging free hydroxyl radicals by the Fenton or Haber–Weiss reaction [1–3].

Cu<sup>2+</sup> toxicity observed in Wilson's disease, an inherited disease associated with excessive Cu<sup>2+</sup> accumulation [4,5]. Furthermore, Cu<sup>2+</sup> is an important environmental contaminant and recent evidence suggests that low concentration of the metal in drinking water may cause neurotoxicity in mammals [6]. Cu<sup>2+</sup> can be released in the environment secondary to pesticide and fungicide applications, and from industrial wastes [7–10]. Accordingly, increased levels of Cu<sup>2+</sup> have been noted in surface water and soil in several countries [7–12]. Excessive

ingestion of inorganic Cu<sup>2+</sup> affects cognition and has been implicated in the pathogenesis of numerous neurological and neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis [6,11–14]. Furthermore, studies have shown that copper oxide nanoparticles (CuONPs), used in antimicrobial preparations or intrauterine contraceptive devices, may cross the blood-brain barrier and exert neurotoxic effects by modulating neurotransmitter levels and neurophysiological signaling [15,16].

Given the above observations, studies have been carried out to discover pharmacological agents or preparations from medicinal plants that could modulate, minimize or block the toxic effect of Cu<sup>2+</sup> *in vitro* [17,18]. However, studies on the potential protective effect of *P. boldus* extracts *in vivo* have yet to be carried out.

Boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae) is a tree native from Chile. Its leaves have been used in the treatment of gastrointestinal disorders and to increase bile production [19–21]. The annual world production of *P. boldus* has been estimated to be more than 2000 t of dried leaves in last ten years [22,23]. Traditionally *P. boldus* dry leaves

\* Corresponding author.

E-mail address: [jbtrocha@gmail.com](mailto:jbtrocha@gmail.com) (J.B.T. Rocha).

are used in pharmaceutical commercial preparations as capsules, solutions and tinctures either alone or in association with other digestive plants [19,24]. More recently, *P. boldus* extracts have been investigated as potential sources of industrial products for different purposes other than as phytoterapeutic component [25,26].

Several studies with *P. Boldus* have reported its antioxidant and anti-inflammatory effects, particularly those of its alkaloids and polyphenolic compounds [21,27–31]. To the best of our knowledge, the protective effect *P. boldus* against  $\text{Cu}^{2+}$ -induced toxicity have not yet been investigated comprehensively. Here, *D. melanogaster* was used as alternative organism model to study  $\text{Cu}^{2+}$ -induced toxicity and the potential protection by *P. boldus* extract. *D. melanogaster* is an important model organism for assessing the toxicity or beneficial effects of various chemicals, including those derived from plants [32,33]. Of particular importance, flies have been instrumental in the elucidation of eukaryotic  $\text{Cu}^{2+}$  regulatory mechanisms and they show a remarkable similarity to the biological functions of copper in mammalian cells [34–36].

Herein, we provide evidence, for the first time, that *P. boldus* has the ability to protect against copper-induced toxicity in *D. melanogaster*, *in vivo*. In addition, mechanistic evidence is advanced in support of antioxidant mechanism(s) in the protection afforded by *P. boldus* extracts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB), 5, 50-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide, were purchased from Sigma (USA). Copper sulfate was obtained from Reagen (Brazil). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

### 2.2. *Drosophila melanogaster* stock and culture

*D. melanogaster* wild-type was obtained from the National Species Stock Center (Bowling Green, OH, USA). The flies were maintained on corn meal medium (1% w/v brewer's yeast, 2% w/v sucrose, 1% w/v powdered milk, 1% w/v agar, and 0.08% v/w nipagin) at constant temperature and humidity (22–24 °C; 60–70% relative humidity) under 12 h dark/light cycle conditions.

### 2.3. Plant material

The leaves of *P. boldus* (40 g), obtained from commercial sources, were dried, cut into small pieces and extracted with water (400 mL). After filtration, the water solution was frozen at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  and concentrated under a reduced pressure by lyophilization. The resulting power extract was stored for less than 1 month in a refrigerator at  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For the *D. melanogaster* medium preparation, the *P. boldus* extract was dissolved in distilled water at the concentration of 100 mg/mL. The concentrated *P. boldus* solution was mixed with food medium, providing a final concentration of 5 mg/mL (5 mg of extract per mL of the medium).

### 2.4. $\text{Cu}^{2+}$ exposure and *P. boldus* treatment

Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) and *P. boldus* (aqueous extract) were added into the medium mentioned above at a final concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  1 mM and 3 mM and/or *P. boldus* 5 mg/mL. *D. melanogaster* (both genders) with 1 to 3 days of age were divided into six groups with 30 flies in each: (1) control; (2)  $\text{Cu}^{2+}$  1 mM; (3)  $\text{Cu}^{2+}$  3 mM; (4)  $\text{Cu}^{2+}$  1 mM plus *P. boldus* 5 mg/mL; (5)  $\text{Cu}^{2+}$  3 mM plus *P. boldus* 5 mg/mL; (6) *P. boldus* 5 mg/mL. The flies were maintained in 5 cm x 8 cm vials containing 10 mL of medium. The concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  used in this protocol was based on a survival curve (0.5, 1, 3, 5, 10, 20 mM) (data

not shown), and the highest concentration used (3 mM) caused approximately 50% death ( $\text{LD}_{50}$ ) in the flies after 4 days of exposure. The choice of *P. boldus* aqueous extract concentration was based on previous observations, which showed that *P. boldus* aqueous extract in the range of 5–20 mg/mL did not cause overt signals of toxicity in flies (data not shown).

### 2.5. *in vivo* assays

#### 2.5.1. Survival rate

The survival rate was determined daily by counting the number of living flies until the end of the experimental period (4 days). One hundred eighty flies per group were included in the survival data (30 flies/3 independent experiments, repeated two times).

#### 2.5.2. Negative geotaxis

Locomotor ability of flies treated with  $\text{Cu}^{2+}$  and *P. boldus* was assessed in a negative geotaxis assay [37]. The flies (both sexes) were immobilized under mild ice anesthesia and placed separately in a vertical glass columns (length: 10 cm, diameter: 1.5 cm/15 flies each). After the recovery from cold anesthesia (20 min) the flies were carefully tapped to the bottom of the column. The number of flies that climbed up to the 6 cm mark of the column in 6 s was recorded. The scores represent the mean of the number of flies at the top and it is expressed as a percentage in relation to the total number of flies. The means of the groups were representative of three independent experiments (repeated three times with 1 min interval between the trials).

### 2.6. *Ex vivo* assays

#### 2.6.1. Preparation of sample for biochemical assays

For the biochemical assays, 25 flies per group were anaesthetized on ice, weighed, homogenized in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 (1:10 (flies/volume ( $\mu\text{L}$ ))), and centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant was separated from the pellet and used for the biochemical assays of acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST).

#### 2.6.2. Determination of glutathione S-transferase activity

GST activity was determined using CDNB and glutathione (GSH) as substrate [38]. The reaction was performed in 270  $\mu\text{L}$  of GST buffer (165 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 2.5 mM EDTA), 20  $\mu\text{L}$  of sample, 10  $\mu\text{L}$  of 50 mM GSH and 10  $\mu\text{L}$  of 25 mM CDNB. The thioether formation was monitored for 6 min (30 s intervals) at 340 nm (25 °C) in a SpectraMax plate reader (Molecular Devices). Results were expressed as mmol of product formed per minute per milligram protein using the molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of  $9.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  for GSH-CDNB conjugate.

#### 2.6.3. Determination of acetylcholinesterase activity

Determination of AChE activity was carried out according to Ellmann (1961) [39]. The reaction was performed in the presence of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM DTNB and 0.8 mM acetylthiocholine. The reading was monitored for 5 min (15 s intervals) at 412 nm with a SpectraMax plate reader (Molecular Devices, USA). The results were standardized by the protein content of the samples. Enzyme activity was calculated as  $\mu\text{mol}$  of acetylthiocholine hydrolyzed per mg protein per minute and expressed as percentage in relation to the control.

#### 2.6.4. RNA isolation and mRNA expression analysis by quantitative real-time RT-PCR

RNA was isolated from 25 flies per group using the Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). The primer sequences used for this study were catalase (Cat), superoxide dismutase (Sod1), thioredoxin reductase-1 (TrxR1), acetylcholinesterase (isoform B) (Ace), Kelch-like erythroid cell-derived

**Table 1**  
Sequences of qRT-PCR primers.

	Primer sequence
Cat LEFT	5' AACCTCTTGGCCTGCTCGTA 3'
Cat RIGHT	5' ACCAGGCATCAAGAATCTG 3'
Ace LEFT	5'TCGGTGCGTCACTACATGACTC 3'
Ace RIGHT	5' TCGTGGTCAACGCTGGTCC 3'
TrxR1 LEFT	5' CGTCTATTGTGCTGCGTGG 3'
TrxR1 RIGHT	5' AGCTTGCATCATCCTGCTT 3'
Sod1 LEFT	5' GGAGTCGGTGATGTTGACCT 3'
Sod1 RIGHT	5' GTTCGGTGACAACACCAATG 3'
Nrf2 LEFT	5' AGGCATCTCGAACAAGTTT 3'
Nrf2 RIGHT	5' CGTGTGTTACCCCTGGACT 3'
CtrlA LEFT	5' ATACCGCTGTGATCGTGGTG 3'
CtrlA RIGHT	5' CGCAGGAAGTAAATCATTAAAT 3'
Atp7A LEFT	5' TCGGTGTCCATGTGCTTTG 3'
Atp7A RIGHT	5' CAGTCTTTACCTTGTGGGCA 3'
Gpdh LEFT	5' ATGGAGATGATTCGTTCTGT 3'
Gpdh RIGHT	5' GTCCTCAATGGTTTTTCCA 3'

– associated protein 1 (Keap1), copper transport protein 1A (Ctr1A), P-type ATPase copper transporter 7 (Atp7A) (Table 1). Gene specific primer sequences were based on published sequences in GenBank Overview (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) designed with Primer3 program version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and custom made by Invitrogen1 (Table 1). After quantification, total RNA was treated with DNase I (Invitrogen1). Approximately 1 µg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using the M-MLV reverse transcriptase enzyme and random primer (Invitrogen). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed in 20 µL of reaction mixture containing 1 µL RT product (cDNAs) as template, 1 x PCR buffer, 25 µM dNTPs, 0.2 mM of each primer, 1.5–2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 x SYBR GreenI Molecular Probes1, and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) [40,41]. The thermal cycle was carrier in a Thermocycler StepOne Plus (Applied Biosystems) and the protocol was performed as follow: activation of the Taq DNA polymerase at 95 °C for 5 min followed of 40 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, and 25 s at 72 °C. SYBR fluorescence was analyzed by Step One software version 2.0 (Applied Biosystems, NY), and the CT value for each sample was calculated using the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method [40]. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (Gpdh) was used as the reference gene and its expression was not modified by Cu<sup>2+</sup> treatment. Each well was analyzed in quadruplicates, and the ΔCT value was obtained by subtracting the GPDH CT value from the CT value for each of the genes of interest. The experiment was repeated three times and qRT-PCR quantification was performed in triplicate.

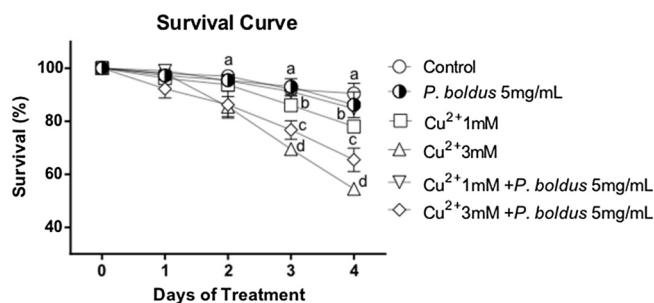
### 2.6.5. Protein determination

Protein concentrations in the whole body homogenates was carried out as described by Lowry et al. (1951) [42], using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### 2.6.6. Cu<sup>2+</sup> content determination

Cu<sup>2+</sup> content analysis in fly samples was performed by inductively coupled plasma atomic emission Spectrometry (ICPE-9000; Shimadzu Scientific Instruments). Twenty flies (0,018 g) in each experimental group were digested in 0.2 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> in an overnight incubation at 70 °C. After digestion, samples were diluted with deionized water (1.8 mL), and the total volume (2 mL) was transferred to graduated poly-propylene vials. Cu<sup>2+</sup> analysis was performed with a Hydride Vapor Generator system (HVG-1; Shimadzu Scientific Instruments). The analytical standard Cu<sup>2+</sup> (Merck®) was used to generate a standard curve (0; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 15 and 20 ppm) (r = 0.99930) [43].

Since the contents of copper found at the end of the treatment of 4 days were too high (Fig. 1A) and could reflect the copper in the



**Fig. 1.** Effect of *P. boldus* extract in the survival rate of flies exposed to Cu<sup>2+</sup>. The numbers of surviving flies are represented as% of the initial number of flies (30 flies per vial). Data represent means ± SEM of three independent biological replicates performed in duplicates. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups (p < 0.05).

digestive tract of the flies, we also determine the copper content after one day of washing out of copper. For this end, at the 4th day (the last day of treatment), flies from all groups were transferred to vials containing the basal diet. After 24 h, they were killed and digested as described above.

### 2.7. Statistical analysis

The results represent the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by one, two or three-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post-hoc* test, when appropriated. Differences were considered statistically significant among groups when p < 0.05, using the GraphPad Prism5 program.

## 3. Results

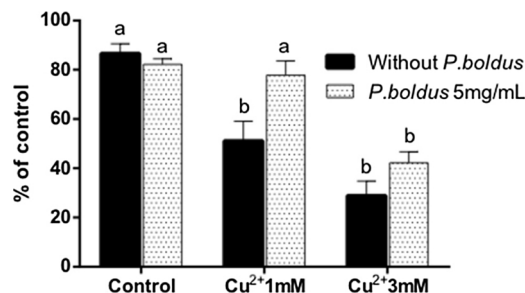
### 3.1. In vivo parameters

#### 3.1.1. Survival rate of flies exposed to Cu<sup>2+</sup> and co-treated with *P. boldus*

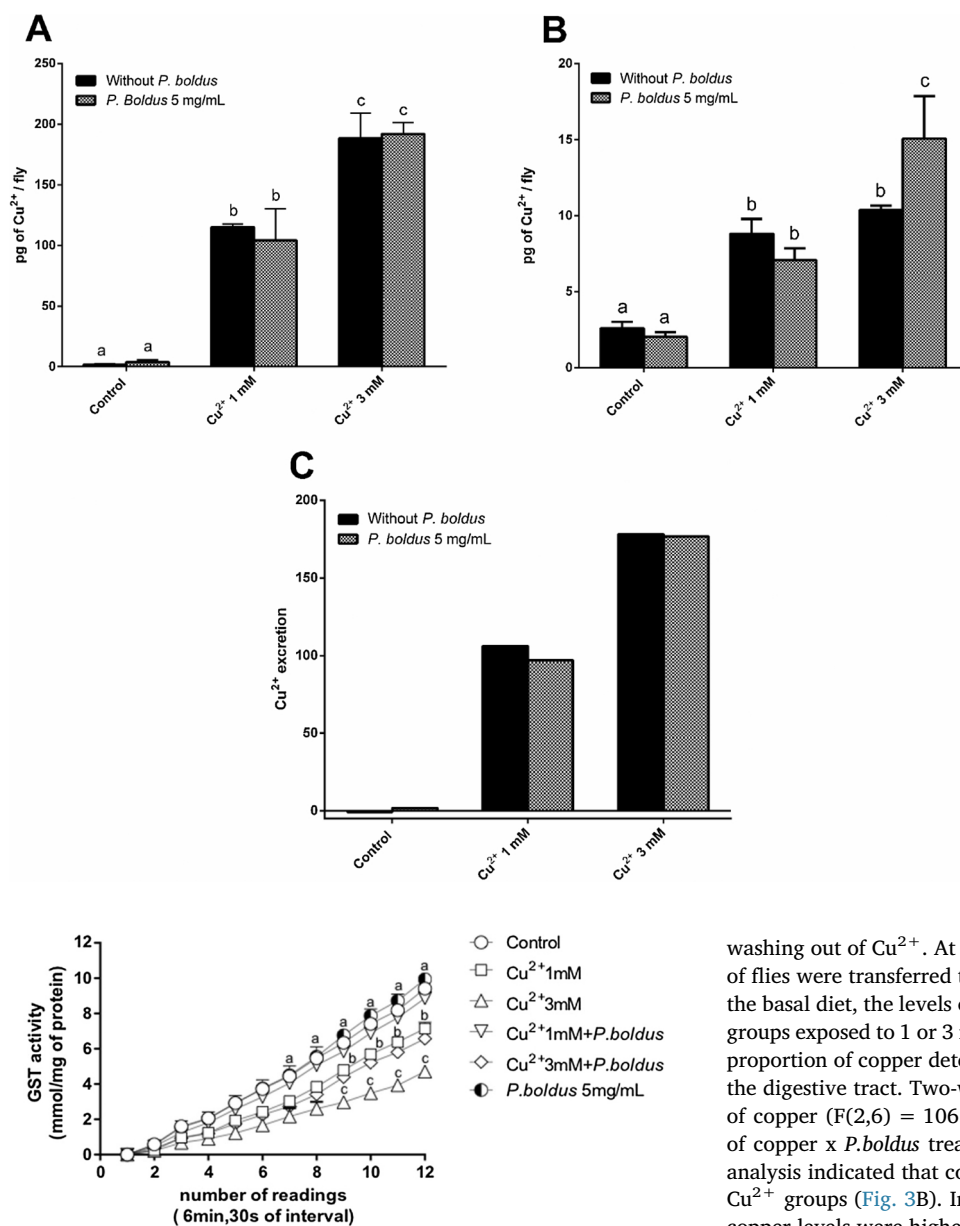
Cu<sup>2+</sup> exposure caused a time- and dose-dependent decrease in the fly survival relative to the controls. The Cu<sup>2+</sup>-induced increased mortality was attenuated by *P. boldus*. The protective efficacy of the *P. boldus* extract was higher in the group exposed to 1 mM Cu<sup>2+</sup> plus *P. boldus* than in the 3 mM Cu<sup>2+</sup> plus *P. boldus*. *P. boldus* alone did not alter the survival rate when compared to the control group (Fig. 1).

#### 3.1.2. Negative geotaxis in flies simultaneously treated with Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus*

Flies exposed to Cu<sup>2+</sup> exhibited a significant dose-dependent reduction in climbing ability when compared to the control ((p < 0.05) Fig. 2). The effect of Cu<sup>2+</sup> was attenuated by *P. boldus* treatment. The protective effects of *P. boldus* extract was higher in the group exposed to



**Fig. 2.** Effect of *P. boldus* extract in the negative geotaxis response (climbing) in flies exposed to Cu<sup>2+</sup> for four consecutive days. The total number of flies (90 per group) represents the total of three independent experiments (15 flies per analysis) carried out in duplicates. Results represent the mean ± SEM (n = 3). Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups (p < 0.05).



**Fig. 3.** Cu<sup>2+</sup> levels in flies exposed to CuSO<sub>4</sub> (1 and 3 mM) alone or with *P. boldus* extract 5 mg/mL. (A) Cu<sup>2+</sup> levels after four consecutive days of exposure. (B) Cu<sup>2+</sup> levels after four consecutive days of exposure and one day of washing out of Cu<sup>2+</sup> (all flies were fed basal diet for 24 h after the 4th day of treatment with Cu<sup>2+</sup>). (C) Cu<sup>2+</sup> excretion after one day (these hypothetical values were calculated by subtracting the mean levels of copper determined at the end of the 4th day from the levels found after 24 h of copper-washing out (day 5)). Results are expressed as the mean ± SEM (n = 3). Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups (p < 0.05).

**Fig. 4.** GST activity after exposure of flies to 1 mM and 3 mM of Cu<sup>2+</sup> in the presence or absence of *P. boldus* leaf extract (5 mg/mL). Data are expressed as the mean ± SEM of three independent replicates carried out in duplicate. Data were analyzed by three way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups (p < 0.05).

1 mM Cu<sup>2+</sup> than in the group exposed to 3 mM Cu<sup>2+</sup>. Flies treated with *P. boldus* alone did not differ from the control group (p > 0.10).

### 3.2. Ex vivo parameters

#### 3.2.1. Copper content in flies exposed to Cu<sup>2+</sup> and co-treated with *P. boldus*

At the end of the treatment (day 4), flies exposed to Cu<sup>2+</sup> (1 and 3 mM) had increased levels of copper varying from 36 to 40 (1 mM) to 65–66 times (3 mM) in relation to the groups not exposed to copper (Fig. 3). Co-treatment with *P. boldus* did not alter Cu<sup>2+</sup> content when compared to the group treated with copper alone. The levels of Cu<sup>2+</sup> found in flies treated with *P. boldus* alone did not differ from control group (Fig. 3).

Since the levels of copper determined just after the end of the treatment could be biased by the presence of Cu<sup>2+</sup> in the digestive tract; we have also determined the copper levels after one day of

washing out of Cu<sup>2+</sup>. At the end of the 4th day of treatment, all groups of flies were transferred to vials containing the basal diet. After 24 h in the basal diet, the levels of copper in flies decreased considerably in the groups exposed to 1 or 3 mM of Cu<sup>2+</sup> (Fig. 3B), indicating that a greater proportion of copper determined in Fig. 3A was due to Cu<sup>2+</sup> present in the digestive tract. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of copper (F(2,6) = 106.3, p < 0.0001) and a significant interaction of copper x *P. boldus* treatment (F(2,6) = 10.26, p < 0.011). *Post-hoc* analysis indicated that copper levels were increased in the 1 and 3 mM Cu<sup>2+</sup> groups (Fig. 3B). In addition, the *post-hoc* analysis indicated that copper levels were higher in the 3 mM Cu<sup>2+</sup> + *P. boldus* group than in the 3 mM Cu<sup>2+</sup>. The levels of copper in the groups exposed to 1 mM Cu<sup>2+</sup> were not altered by *P. boldus* extract (Fig. 3B).

#### 3.2.2. Glutathione S-transferase activity in flies simultaneously treated with Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus*

Flies treated with 1 or 3 mM Cu<sup>2+</sup> had a decrease in GST activity in a dose-dependent manner when compared to the control group. *P. boldus* co-treatment blunted the inhibition of GST activity caused by 1 mM Cu<sup>2+</sup>. *P. boldus* *per se* did not alter GST activity (Fig. 4).

#### 3.2.3. Acetylcholinesterase activity in flies simultaneously treated with Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus*

AChE activity was measured after 4 days exposure to Cu<sup>2+</sup> alone or Cu<sup>2+</sup> plus *P. boldus*. Copper at concentration of 1 mM and 3 mM caused a small but significant decrease in AChE activity. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* analysis showed that co-treatment with *P. boldus* (5 mg/mL) significantly blunted the Cu<sup>2+</sup>-induced decrease in AChE. No significant difference was observed in flies exposed to *P. boldus* alone when compared to the control (Fig. 5).

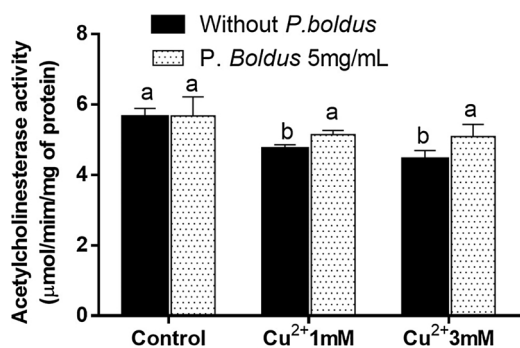


Fig. 5. AChE activity after exposure of flies to 1 mM and 3 mM Cu<sup>2+</sup> in the presence or absence of *P. boldus* leaf extract (5 mg/mL) for four consecutive days. Data are presented as the mean ± SEM of three independent replicates carried out in duplicate. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.4. Effect of *P. boldus* in *sod1*, *cat*, *TrxR1* and *nrf2* mRNA levels of flies exposed to Cu<sup>2+</sup>

Exposure to 3 mM Cu<sup>2+</sup> caused significant increase in the expressions of Sod1 (Fig. 6A), TrxR1 (Fig. 6B), Cat (Fig. 6C) and Nrf2 (Fig. 6D) genes, when compared to control flies ( $p < 0.05$ ). Exposure to 1 mM Cu<sup>2+</sup> altered only Cat mRNA levels (Fig. 6C) compared to control ( $p < 0.05$ ). The 3 mM Cu<sup>2+</sup>-induced effect on antioxidant genes expression was blunted by treatment with the *P. boldus* extract. However, *P. boldus* treatment was not effect in gene expression of Cat in *D. melanogaster* exposed to Cu<sup>2+</sup> 1 mM. The mRNA levels of Sod1, TrxR1, Cat and Nrf2 in flies treated with *P. boldus* alone were indistinguishable from control (Fig. 6).

### 3.2.5. Effect of *P. boldus* in *ace* mRNA levels of flies exposed to Cu<sup>2+</sup>

Cu<sup>2+</sup> exposure increased Ace gene expression and the co-treatment with *P. boldus* abolished this up-regulation but only in flies exposed to 3 mM of Cu<sup>2+</sup> (Fig. 7). Treatment with *P. boldus* extract alone did not modify the expression of Ace gene in relation to the control (Fig. 7).

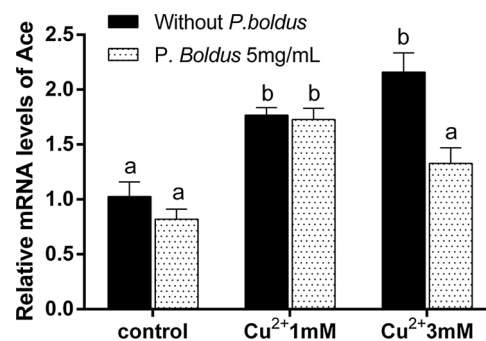


Fig. 7. Gene expression of Ace. Results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments performed in quadruplicate. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.6. Effect of *P. boldus* in copper transporter genes mRNA levels of flies exposed to Cu<sup>2+</sup>

We analyzed the effects of *P. boldus* extract and Cu<sup>2+</sup> on the expression of two genes involved in copper homeostasis [44], namely, Cu-ATPase (Atp7) and the high affinity copper uptake protein (Ctr1A) (Fig. 8). Exposure to 3 mM Cu<sup>2+</sup> caused a significant increase in the levels of mRNA of Atp7A and Ctr1A. Co-treatment with *P. boldus* (5 mg/mL) blunted the increase in Atp7A mRNA levels, and they were indistinguishable from control. The same pattern was obtained for the Ctr1A gene; however, co-treatment with *P. boldus* resulted in a significant decrease in the expression of Ctr1A when compared to the control ( $p > 0.05$ ) (Fig. 8B). *P. boldus* *per se* did not modify Atp7A and Ctr1A expression (Fig. 8A and B).

## 4. Discussion

*D. melanogaster* has been previously used as an alternative and complementary model for studying disorders potentially associated with copper dyshomeostasis [45]. The objective of this study was to evaluate potential protective effects of *P. boldus* against Cu<sup>2+</sup>-induced toxicity in *D. melanogaster*. Cu<sup>2+</sup> is an established hepatotoxin and *P.*

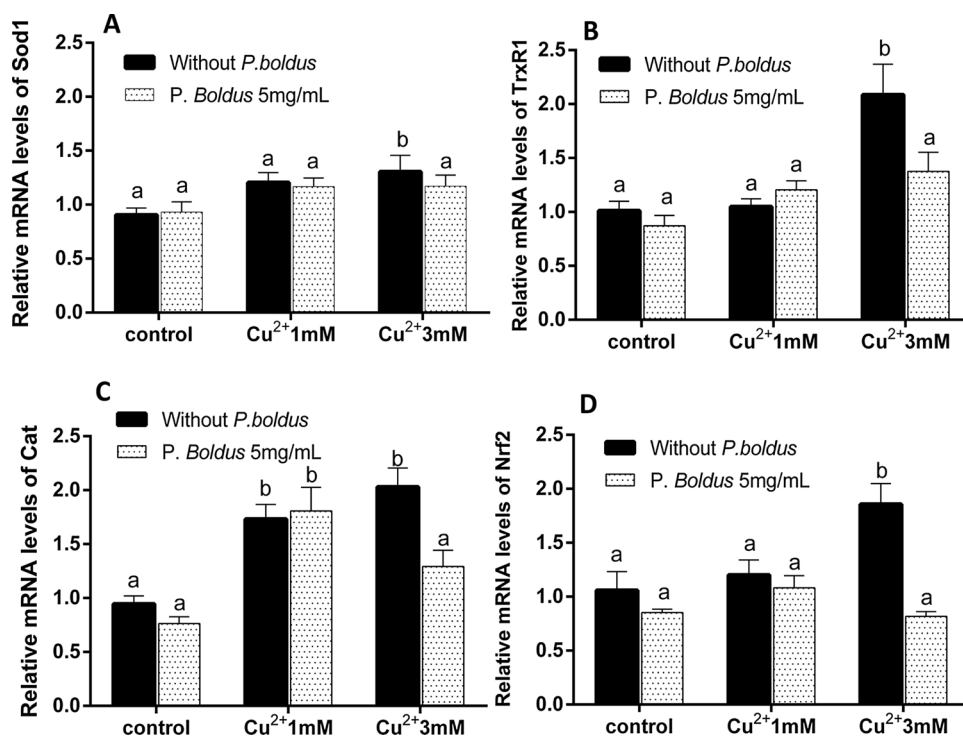
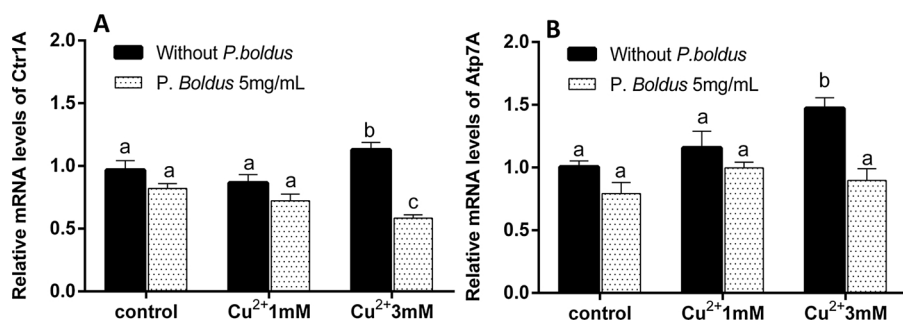


Fig. 6. Gene expression of Sod1 (A), TrxR1 (B), Cat (C) and Nrf2 (D). Results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments performed in quadruplicate. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 8.** Gene expression of Ctr1A (A), and Atp7A (B). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments performed in quadruplicate. Data were analyzed by two way ANOVA followed by Bonferroni *posthoc* test. Different letters indicate significant differences among the groups ( $p < 0.05$ ).

*boldus* extract has been historically used in folk medicine for the treatment of liver diseases and gastrointestinal disorders [19,27,30,46,47]. The therapeutic properties *P. boldus* have been attributed to antioxidant activity associated with the presence of polyphenolic compounds, such as boldine (an alkaloid), flavonoids and boldoglycine (a glucoside) [28,31,48,49,81–83]. Chemical analysis of leaf extracts revealed more than 30 compounds, which are known to possess cytoprotective and anti-inflammatory effects [49].

For first time, we demonstrate that in *D. melanogaster* aqueous extract of *P. boldus* was effective in reducing oxidative stress and neurobehavioral manifestations (motor impairments) induced by Cu<sup>2+</sup>. It is noteworthy that Cu<sup>2+</sup> may be neurotoxic both in mammals and in flies [50–54].

Copper functions as cofactor in electron transferring proteins, which are essential for cell physiology [55,56]. Metabolism of copper involves the interaction of the metal with cysteine-containing proteins, for instance, metallothionein, albumin and ceruloplasmin [1,57]. These cysteine-rich proteins can chelate copper and are essential in protecting against the toxicity caused by excess of Cu<sup>2+</sup> [58]. If not bound to its trafficking or storage proteins, copper is an extremely toxic metal. The capacity of Cu<sup>2+</sup> to oxidize thiol groups can disrupt the balance of intra- and inter-subunit thiol/disulfide of proteins, inhibiting their biological activity [59].

Oxidative stress is also an important factor in copper toxicity. Excesses of copper may generate conditions that facilitate superoxide-yielding redox cycling. The oxidation of Cu<sup>1+</sup> to Cu<sup>2+</sup> can produce hydroxyl radical from hydrogen peroxide by Fenton reaction. Hydroxyl radicals are highly reactive and can cause oxidative damage in cell membranes, proteins and DNA. The generation of reactive oxygen species (ROS) can also oxidize redox sensitive proteins, which in turn, can affect cellular structure and function [60–63].

Here, we have demonstrated that exposure of *D. melanogaster* to Cu<sup>2+</sup> decreased GST activity and *P. boldus* extract blunted this effect. GST is a multifunctional enzyme that plays an important role in detoxification of xenobiotics and protection against oxidative stress, and its native conformation has cysteine-rich domains [64]. Therefore, it is plausible that Cu<sup>2+</sup> oxidized GST thiol groups, which inactivated the enzyme. In accordance, literature studies have indicated that Cu<sup>2+</sup> can induce the oxidation of thiol-containing proteins, for instance,  $\alpha$ -synuclein, which triggers protein aggregate formation [65,66]. Cu<sup>2+</sup>-induced inhibition of GST activity and sulfhydryl group oxidation may further contribute ROS formation [67,68]. Alternatively, Cu<sup>2+</sup> could oxidize GSH and indirectly could interfere in GST activity by depleting its substrate [61]. The molecular mechanisms by which *P. boldus* crude extract can be associated with its polyphenol constituents, such as catechin, boldine, caffeic acid, rutin, quercitrin, quercetin and kaempferol [31], all of which have inherent antioxidant properties.

Copper can promote the Fenton reaction, i.e., the generation of hydroxyl radicals ( $\cdot$ OH) and/or other ROS as by product of the reaction of Cu<sup>2+</sup> with hydrogen peroxide [69,70]. In *D. melanogaster*, qRT-PCR analysis showed that Cu<sup>2+</sup> exposure increased mRNA levels of the antioxidant enzymes Sod1, Cat, and TrxR1, likely representing a compensatory response to oxidative insults. Besides, Nrf2, an emerging

regulator of cellular resistance to oxidants was tested here. Nrf2 activity is repressed by Keap1 homology, in the absence of oxidative stress [71]. Nrf2 activation occurs due to the oxidative or covalent modification of cysteine residues in Keap1 by ROS or directly by Cu<sup>2+</sup>. After the oxidation of thiol groups, the interaction of Keap1 with Nrf2 is blocked, releasing Nrf2 from the inhibitory Keap1. Nrf2 then migrates to the nucleus and bind in the antioxidant response elements (ARE) in DNA by activating it. The activation of ARE induces the transcription of target genes such as Sod1 [72]. In the present study, we observed that Cu<sup>2+</sup> exposure markedly increase the mRNA levels of Nrf2, demonstrating an involvement in the copper-induced antioxidant defense system (Fig. 7D). Decreased gene expression of the antioxidant enzymes Sod1, Cat, TrxR1 and Nrf2 was observed in the groups co-treated with Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus*, when compared with Cu<sup>2+</sup> alone. Therefore, we establish, for the first time, that *P. boldus* has ability to modulate copper-induced gene expression of antioxidant enzymes Sod1, Cat, TrxR1 and Nrf2 in *D. melanogaster*.

Cells prevent excessive accumulation of free Cu<sup>2+</sup> by the regulation of uptake, sequestration and efflux of this metal [2]. The Ctr1 is a Cu<sup>2+</sup> transporter responsible for the uptake of at least 80% of Cu<sup>2+</sup> [73]. Intracellularly, the Cu<sup>2+</sup> concentration is controlled by two Cu<sup>2+</sup> efflux proteins, P-type ATPases Atp7A and Atp7B, which transport Cu<sup>2+</sup> to cupro-enzymes in the secretory pathway, such as tyrosinase and ceruloplasmin [74]. Thus, the effect of Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus* treatment on the expression of these copper transport proteins was evaluated. Our results indicated that high concentration of Cu<sup>2+</sup> (3 mM) caused a significant increase in cellular Cu<sup>2+</sup> accumulation (Fig. 3) and it was associated with increased Atp7A and Ctr1A gene expression. It is known that when the intracellular Cu<sup>2+</sup> level increase, Atp7A and Atp7B can be translocated from the trans-Golgi network (TGN) to the cell surface and facilitate Cu<sup>2+</sup> transport across epithelial and endothelial membranes [34,75]. Thus, we posit that the elevated levels of Atp7A gene expression noted herein represent a homeostatic response to the high intracellular Cu<sup>2+</sup> levels. Indeed, in *D. melanogaster*, excess copper caused overexpression of Atp7A [50] and we posit that increased intracellular copper concentrations led to a compensatory increase Atp7A mRNA levels. However, the mRNA of Ctr1A was also increased, which may indicate that the overall homeostatic cellular response is not being able to handle the exposure to high levels of Cu<sup>2+</sup>. Co-treatment with *P. boldus* extract restored Atp7A and Ctr1A mRNA to levels indistinguishable from control; paradoxically, Cu<sup>2+</sup> deposition was increased in flies simultaneously exposed to *P. boldus* and 3 mM of Cu<sup>2+</sup> *D. melanogaster*. The weak ability of *P. boldus* in blunting the toxicity induced by 3 mM of Cu<sup>2+</sup> can be related to the incapacity of *D. melanogaster* to adapt metabolically to Cu<sup>2+</sup> excess.

Flies exposed to Cu<sup>2+</sup> showed decreased survival during the 4-day exposure period. Co-treatment with Cu<sup>2+</sup> and *P. boldus* reduced the Cu<sup>2+</sup>-induced lethality, irrespective of the accumulation of copper. This result indicated the presence of protective bioactive compounds in *P. boldus* that might be decreasing the premature mortality of *D. melanogaster* exposed to high levels of Cu<sup>2+</sup>, possibly by reducing free radicals overproduction and/or increasing antioxidant defenses.

Several studies have established the toxicological effects of copper

on the nervous system [5,6,13,59,64,70]. To further investigate the efficacy of *P. boldus* in attenuating the toxic effects associated with nervous system copper content, the locomotor activity of *D. melanogaster* was tested. Exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  was detrimental to neuronal activity, resulting in locomotor deficits characterized by negative geotaxis test (climbing), corroborating other studies on neurobehavioral effects of copper in flies [50]. Notably, the locomotor impairments caused by  $\text{Cu}^{2+}$  were reversed by the co-treatment with *P. boldus*.

Cholinergic signaling modulates cognitive and behavioral functions and it can be altered by  $\text{Cu}^{2+}$  [33,76–79]. Therefore, the activity of AChE, an enzyme that participates in cholinergic neurotransmission [79] was tested here [33,78,79]. Flies exposed to  $\text{Cu}^{2+}$  showed a significant decrease in AChE activity [81]. In contrast, the levels of Ace mRNA levels were increased upon  $\text{Cu}^{2+}$  exposure, likely reflecting an adaptation to AChE inhibition by  $\text{Cu}^{2+}$ . The decrease in AChE activity might be explained by copper-induced protein unfolding and aggregation [68,80]. Studies in larvae and adult *D. melanogaster* demonstrated that cholinergic neurons play an important role in the regulation of locomotion [84–88]. In accordance, the decrease in AChE activity in flies exposed to  $\text{Cu}^{2+}$  might be associated with impairments in locomotor activity, thus contributing to the general toxicity of  $\text{Cu}^{2+}$  in adult flies.

## 5. Conclusion

In summary, we demonstrated that *P. boldus* can blunt the toxicity induced by  $\text{Cu}^{2+}$  via diverse molecular mechanisms. To our knowledge, this is the first demonstration that *P. boldus* can protect against the neurobehavioral toxicity of  $\text{Cu}^{2+}$  in *D. melanogaster*. The results presented here demonstrated that *D. melanogaster* represents a suitable model for studies on the toxicity of copper, further extending the protective effects of *P. boldus* in a new model of  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity. Consequently, studies investigating the potential effectiveness of *P. boldus* in the management of diseases associated with copper overload are needed.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

C.V.K., N.B. and J.B.T.R. were recipient of CNPq fellowship. Work supported by CNPq, CAPES, INCT-EN: For Cerebral Diseases, Excitotoxicity and Neuroprotection. for Excitotoxicity and Neuroprotection.FAPERGS/CNPq12/2014-PRONEX: no. 16/2551-0000 499-4. M.A. was supported by grants from the NIH R01ES10563, R0ES07331, R01ES020852, and R21ES025415.

## References

- M.M.O. Peña, J. Lee, D.J. Thiele, A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution, *J. Nutr.* 129 (7) (1999) 1251–1260.
- A. Southon, R. Burke, J. Camakaris, What can flies tell us about copper homeostasis? *Metallomics* 5 (10) (2013) 1346–1356.
- Z. Tumer, L.B. Moller, Menkes disease, *Eur. J. Hum. Genet.* 8 (2010) 511–518.
- F. Wu, J. Wang, C. Pu, L. Qiao, C. Jiang, Wilson's Disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3) (2015) 6419–6431.
- A. Ahuja, K. Dev, R.S. Tanwar, K.K. Selwal, P.K. Tyagi, Copper mediated neurological disorder: visions into amyotrophic lateral sclerosis: alzheimer and menkes disease, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 11–23.
- D.L. Sparks, B.G. Schreurs, Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (19) (2003) 11065–11069.
- N.C. Bonai, G.M. Souza-Franco, O. Fogolari, D.J.C. Mocelin, J. Dalmagro, Distribution of metal in the sediment of the Itá Reservoir, Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 21 (2) (2009) 245–250.
- L. Järup, Hazards of heavy metal contamination, *Br. Med. Bull.* 68 (2003) 167–182.
- R.P. Schwarzenbach, T. Egli, T.B. Hofstetter, U. Von Gunten, B. Wehrli, Global water pollution and human health, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35 (2010) 109–136.
- A. Ciatelli, S. Castiglione, A step forward in tree physiological research on soil copper contamination, *Tree Physiol.* 36 (4) (2016) 403–406.
- Y. Christen, Oxidative stress and alzheimer disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2) (2000) 621s–629s.
- R.J. Ferrante, S.E. Browne, L.A. Shinobu, A.C. Bowling, M.J. Baik, U. Mac Garvey, N.W. Kowall, R.H. Brown, M.F. Beal, Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 69 (5) (1997) 2064–2074.
- G. Eskici, P.H. Axelsen, Copper and oxidative stress in the pathogenesis of alzheimer's disease, *Biochem* 14 (2012) 6289–6311.
- G.J. Brewer, Copper toxicity in alzheimer's disease: cognitive loss from ingestion of inorganic copper, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26 (2–3) (2012) 89–92.
- T. Sun, Y. Yan, Y. Zhao, F. Guo, C. Jiang, S.M. Srinivasula, Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549Cells, *PLoS One* 7 (8) (2012) 43442.
- K. Donaldson, C.A. Poland, Inhaled nanoparticles and lung cancer—what we can learn from conventional particle toxicology, *Swiss Med. Wkly.* 19 (142) (2012) 13547.
- M. Dutta, A.K. Ghosh, P. Mishra, G. Jain, V. Rangari, A. Chattopadhyay, T. Das, T. Bhowmick, D. Bandyopadhyay, Protective effects of piperine against copper ascorbate induced toxic injury to goat cardiac mitochondria in vitro, *Food Funct.* 5 (9) (2014) 2252–2267.
- F. Duman, I. Ocsoy, F.O. Kup, Chamomile flower extract-directed CuO nanoparticle formation for its antioxidant and DNA cleavage properties, *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.* 60 (2016) 333–338.
- H. Speisky, B.K. Cassels Boldo, boldine: an emerging case of natural drug development, *Pharmacol. Res.* 29 (1994) 1–12.
- G. Schmeda-Hirschmann, J.A. Rodriguez, C. Theodulox, S.L. Astudillo, G.E. Feresin, A. Tapia, Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol (Boldo), *Free Radic. Res.* 37 (4) (2003) 447–452.
- A.L.T. Ruiz, D. Taffarello, V.H. Souza, J.E. Carvalho, Pharmacology and toxicology of *Peumus boldus* and *Baccharis genistelloides*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2) (2008) 295–300.
- C. Berríos, Efecto de la densidad de plantación y dos niveles de riego sobre el rendimiento y los principios activos en boldo (*Peumus boldus* Mol). Memoria de título, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, 2003 (p.39).
- H. Vogel, B. González, I. Razmilic Boldo, (*Peumus boldus*) cultivated under different light conditions, soil humidity and plantation density, *Ind. Crops Prod.* 34 (2) (2011) 1310–1312.
- N.S. Girardi, D. García, S.N. Robledo, M.A. Passone, A. Nesci, M. Etcheverry, Microencapsulation of *Peumus boldus* oil by complex coacervation to provide peanut seeds protection against fungal pathogens, *Ind. Crops Prod.* 92 (2016) 93–101.
- L. Petigny, S. Périno, M. Minuti, F. Visinoni, J. Wajzman, F. Chemat, Simultaneous microwave extraction and separation of volatile and non-volatile organic compounds of boldo leaves from lab to industrial scale, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (5) (2014) 7183–7198.
- D.S.B. De Castro, D.B. da Silva, J.D. Tibúrcio, M.E.G. Sobral, V. Ferraz, A.G. Taranto, J.E. Serrão, J.M. de Siqueira, S.N. Alves, Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*, *Exp. Parasitol.* 171 (2016) 84–90.
- M.C. Lanhers, M. Joyeux, R. Soulimani, J. Fleurentin, M. Sayag, F. Mortier, C. Younos, J.M. Pelt, Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*, *Planta Med.* 57 (2) (1991) 110–115.
- P. O'brien, C. Carrasco-Pozo, H. Speisky, Boldine and its antioxidant or health-promoting properties, *Chem. Biol. Interact.* 159 (1) (2006) 1–17.
- J. Fernández, P. Lagos, P. Rivera, E. Zamorano-Ponce, Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver, *Phytother. Res.* 23 (7) (2009) 1024–1027.
- J.C. Fuente, N. Quezada, J.M. Valle, Solubility of boldo leaf antioxidant components (Boldine) in high-pressure carbon dioxide, *Fluid Phase Equilib.* 235 (2) (2005) 196–200.
- C.V. Klimaczewski, R.A. Saraiva, D.H. Roos, A. Boligon, M.L. Athayde, J.P. Kamdem, N.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe (II)-citrate in rat liver mitochondria in vitro, *Ind Crops Prod.* 54 (2014) 240–247.
- K. Panchal, A.K. Tiwari, *Drosophila melanogaster* a potential model organism for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 1331–1345.
- J.J. Soares, D.T. Rodrigues, M.B. Gonçalves, M.C. Lemos, M.S. Gallarreta, M.C. Bianchini, M.C. Gayer, R.L. Puntel, R. Roehrs, E.L.G. Denardin, Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 245–251.
- K. Balamurugan, W. Schaffner, Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (7) (2006) 737–746.
- S.W. Mercer, R. Burke, Evidence for a role for the putative *Drosophila* hGRX1 orthologue in copper homeostasis, *Biometals* 29 (4) (2016) 705–713.
- T. Nevitt, H. Ohrvik, D.J. Thiele, How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, ctr1, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1314 (2014) 32–41.
- M.B. Feany, W.W. Bender, A drosophila model of parkinson's disease, *Nature* 404 (6776) (2000) 394–398.
- W.H. Habig, W.B. Jakoby, Assays for differentiation of glutathione-S-transferases, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 398–405.
- G.L. Ellman, G.L. Ellman, Tissue sulphhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1) (1959) 70–77.



- [40] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- [41] J.H. Sudati, F.A. Vieira, S.S. Pavin, G.R.M. Dias, R.L. Seeger, R. Golombieski, M.L. Athayde, F.A. Soares, J.B.T. Rocha, N.V. Barbosa, *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*, *Neurotoxicology* 37 (2013) 118–126.
- [42] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.L. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- [43] R.P. Ineu, C.S. Oliveira, V.A. Oliveira, L. Moraes-Silva, S.C.A. Luz, M.E. Pereira, Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats, *Food Chem. Toxicol.* 58 (2013) 522–529.
- [44] S. Matsumoto, T. Tanaka, H. Kurokawa, K. Matsuno, Y. Hayashida, T. Takahashi, Effect of copper and role of the copper transporters ATP7A and CTR1 in intracellular accumulation of cisplatin, *Anticancer Res.* 27 (4B) (2007) 2209–2216.
- [45] A. Southon, R. Burke, J. Camakaris, What can flies tell us about copper homeostasis, *Metallomics* 5 (2013) 1346–1356.
- [46] M.J. Simirgiotis, G. Schmeda-Hirschmann, Direct Identification of phenolic constituents in boldo *Folium Peumus boldus* Mol. infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (4) (2010) 443–449.
- [47] C. Soto, E. Caballero, E. Pérez, M.E. Zúñiga, Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus Boldus* leaves from Chile, *Food Bioprod. Process.* 92 (3) (2014) 328–333.
- [48] J. Mondal, B. Bishayee, A.K. Panigrahi, A.K. Rahman, A.K. Bukhsh, Low doses of ethanolic extract of Boldo (*Peumus boldus*) can ameliorate toxicity generated by cisplatin in normal liver cells of mice in vivo and in WRL-68 cells in vitro, but not in cancer cells in vivo or in vitro, *J. Integr. Med.* 12 (5) (2014) 425–438.
- [49] P.M. Leite, M.A. Martins, R.O. Castilho, Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 14–21.
- [50] J.E.C. Hwang, M. De Bruyne, C.G. Warr, R. Burke, Copper overload and deficiency both adversely affect the central nervous system of *Drosophila*, *Metallomics* 6 (12) (2014) 2223–2229.
- [51] A. Pal, R. Prasad, An overview of various mammalian models to study chronic copper intoxication associated alzheimer's disease like pathology, *Biomaterials* 28 (1) (2015) 1–9.
- [52] Q. Sun, M. Ying, Q. Ma, Z. Huang, L. Zou, J. Liu, Z. Zhuang, X. Yang, Proteomic analysis of hippocampus in mice following long-term exposure to low levels of copper, *Toxicol. Res.* 5 (2016) 1130–1139.
- [53] J.S. Cristóvão, R. Santos, C.M. Gomes, Metals and neuronal metal binding proteins implicated in alzheimer's disease, *Oxid. Med. Cell Longev.* (2016) 9812178.
- [54] S. Soriano, P. Calap-Quintana, J.V. Llorens, I. Al-Ramahi, L. Gutiérrez, M.J. Martínez-Sebastián, J. Botas, M.D.M. Moltó, Metal homeostasis regulators suppress FRDA phenotypes in a drosophila model of the disease, *PLoS One* 11 (7) (2016) 0159209.
- [55] M. Angelova, S. Asenova, V. Nedkova, K.R. Koleva, Copper in the human organism, *Trakia J. Sci.* 9 (2011) 88–98.
- [56] D.W. Cox, Disorders of copper transport, *Br. Med. Bull.* 55 (3) (1999) 544–555.
- [57] M.C. Linder, *Biochemistry of Copper* 4 Plenum Press, 1991, pp. 73–134.
- [58] H. Shim, Z.L. Harris, Genetic defects in copper metabolism, *J. Nutr.* 133 (5 Suppl. 1) (2003) 1527S–1531S.
- [59] D.J. Waggoner, B.T. Bartnikas, J.D. Gitlin, The role of copper in neurodegenerative disease, *Neurobiol. Dis.* 6 (4) (1999) 221–230.
- [60] S.L. Marklund, P.M. Andersen, L. Forsgren, P. Nilsson, P.I. Ohlsson, G. Wikander, A. Oberg, Normal binding and reactivity of copper in mutant superoxide dismutase isolated from amyotrophic lateral sclerosis patients, *J. Neurochem.* 69 (2) (1997) 675–681.
- [61] M.D. Mattie, J.H. Freedman, Copper-inducible transcription: regulation by metal and oxidative stress-responsive pathways, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2) (2004) C293–C301.
- [62] R. Musacco-Sebio, N. Ferrarotti, C. Saporito-Magrina, Oxidative damage to rat brain in iron and copper overloads, *Metallomics* 6 (2014) 1410–1416.
- [63] D. Ozcelik, H. Uzun, Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain, *Biol. Trace Elem. Res.* 127 (1) (2009) 45–52.
- [64] V. Desai, S.G. Kaler, Role of copper in human neurological disorders, *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (3) (2008) 855S–858S.
- [65] X. Wang, D. Moualla, J.A. Wright, D.R. Brown, Copper binding regulates intracellular alpha-synuclein localisation, aggregation and toxicity, *J. Neurochem.* 113 (3) (2010) 704–714.
- [66] M.C. Miotto, E.E. Rodriguez, A.A. Valiente-Gabioud, V. Torres-Monserrat, A. Binolfi, L. Quintanar, M. Zwickstetter, C. Griesinger, C.O. Fernández, Site-specific copper-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: tightening the link between metal binding and protein oxidative damage in Parkinson's disease, *Inorg. Chem.* 53 (9) (2014) 4350–4358.
- [67] J.S. Rhee, I.T. Yu, B.M. Kim, C.B. Jeong, K.W. Lee, M.J. Kim, S.J. Lee, G.S. Park, Copper induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-triggered oxidative stress in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*, *Aquat. Toxicol.* 15 (132–133) (2013) 182–189.
- [68] V. Kumar, J. Kalita, H.K. Bora, U.K. Misra, Relationship of antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model Original, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 293 (2016) 37–43.
- [69] V. Nischwitz, B. Achim, M. Bernhard, Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: an approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier, *Anal. Chim. Acta.* 627 (2) (2008) 258–269.
- [70] D. Strausak, J.F.B. Mercer, H.H. Dieter, S. Stremmel, G. Multhaup, Copper in disorders with neurological symptoms: alzheimer's, menkes, and wilson diseases, *Brain Res. Bull.* 55 (2) (2001) 175–185.
- [71] A. Pitoniak, D. Bohmann, Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*, *Free Radic. Biol. Med.* 88 (Pt B) (2015) 302–313.
- [72] H. Naa, Y. Surh, Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1, *Free Radic. Biol. Med.* 67 (2014) 353–365.
- [73] E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (alzheimer's, prion, and parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis), *Chem. Rev.* 106 (6) (2006) 1995–2044.
- [74] I. Hamza, J. Prohaska, J.D. Gitlin, Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (3) (2003) 1215–1220.
- [75] L. Nyasae, R. Bustos, L. Braiterman, B. Eipper, A. Hubbard, Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (4) (2007) G1181–94.
- [76] G.M.B. Haverroth, C. Welang, R.N. Mocelin, D. Postay, K.T. Bertoncello, F. Francescon, D.B. Rosemberg, J.D. Magro, C.L. Dalla Corte, Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebra fish (*Danio rerio*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122 (2015) 440–447.
- [77] E.P. Rico, D.B. Rosemberg, K.J. Seibt, K.M. Capiotti, R.S. Da Silva, C.D. Bonan, Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets, *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (6) (2011) 608–617.
- [78] D. Lima, G.M. Roque, E.A. De Almeida, *In vitro* and *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*), *Mar. Environ. Res.* 91 (2013) 45–51.
- [79] B. Nunes, The use of cholinesterases in ecotoxicology, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 212 (2011) 29–59.
- [80] S. Najimi, A. Bouhaimi, M. Daubèze, A. Zekhnini, J. Pellerin, J.F. Narbonne, Use of acetylcholinesterase in Perna perna and Mytilus galloprovincialis as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (6) (1997) 901–908.
- [81] Y.H. Siddique, M. Haidari, W. Khan, A. Fatima, S. Jyoti, S. Khanam, F. Naz, F. Rahul, B.R. Ali, Singh, T. Beg, Mohibullah, A.H. Naqvi, Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in *Drosophila melanogaster* (Oregon R), *Toxicol. Mech. Methods* 25 (6) (2015) 425–432.
- [82] M.C. Bianchini, C.O. Gularte, D.F. Escoto, G. Pereira, M.C. Gayer, R. Roehrs, F.A. Soares, R.L. Puntel, *Peumus boldus* (Boldo) aqueous extract present better protective effect than boldine against manganese-induced toxicity in *D. melanogaster*, *Neurochem. Res.* 41 (10) (2016) 2699–2707.
- [83] E.R. Carmona, M. Reyes-Díaz, J. Parodi, C. Inostroza-Blancheteau, Antimutagenic evaluation of traditional medicinal plants from South America *Peumus boldus* and *Cryptocarya alba* using *Drosophila melanogaster*, *J. Toxicol. Environ. Health A* 80 (4) (2017) 208–217.
- [84] B.G. Iyengar, C.J. Chou, K.M. Vandamme, M.K. Klose, X. Zhao, N. Akhtar-Danesh, A.R. Campos, H.L. Atwood, Silencing synaptic communication between random interneurons during *Drosophila* larval locomotion, *Genes Brain Behav.* 10 (2011) 883–900.
- [85] D. Pauls, A. von Essen, R. Lyutova, L. van Giesen, R. Rosner, C. Wegener, S.G. Sprecher, Potency of transgenic effectors for neurogenetic manipulation in *Drosophila* larvae, *Genetics* 199 (1) (2015) 25–37.
- [86] A. Martín-Peña, A. Acebes, J.R. Rodríguez, V. Chevalier, S. Casas-Tinto, T. Triphan, R. Strauss, A. Ferrús, Cell types and coincident synapses in the ellipsoid body of *Drosophila*, *Eur. J. Neurosci.* 39 (10) (2014) 1586–1601.
- [87] A. Fayyazuddin, M.A. Zaheer, P.R. Hiesinger, H.J. Bellen, The nicotinic acetylcholine receptor *Dalpha7* is required for an escape behavior in *Drosophila*, *PLoS Biol.* 4 (3) (2006) e63.
- [88] M. Gorczyca, J.C. Hall, Identification of a cholinergic synapse in the giant fiber pathway of *Drosophila* using conditional mutations of acetylcholine synthesis, *J. Neurogenet.* 1 (4) (1984) 289–313.

### 3 Discussão

*P. boldus* é uma planta medicinal recomendada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e doenças hepatobiliares (LANHERS et al., 1991). As propriedades farmacológicas de *P. boldus* têm sido atribuídas à atividade antioxidante, as quais estão associadas à presença de compostos polifenólicos tais como o alcalóide boldina (SPEISKY et al., 1991; JANG et al., 2000). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico de *P. boldus* contra os efeitos tóxicos induzidos pelos metais  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , agentes oxidantes cuja a citotoxicidade envolve a produção exacerbada de EROS e consequente estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990, KOPPENOL, 2001). De forma geral, foi constatado que *P. boldus* exerceu efeito protetor contra danos induzidos por  $\text{Fe}^{2+}$  em mitocôndrias hepáticas de roedores *in vitro*, bem como protegeu *D. melanogaster* dos efeitos tóxicos mediados pela exposição ao  $\text{Cu}^{2+}$ ; e que tais efeitos podem estar relacionados com a composição fenólica do extrato bruto.

O fígado é um órgão importante no metabolismo do  $\text{Fe}^{2+}$  e as mitocôndrias são um dos sítios intracelulares que usam este metal para exercer diferentes funções (BELYAEVA et al., 2011, MENA et al., 2015). Neste trabalho, mostramos que o  $\text{Fe}^{2+}$  induziu disfunção mitocondrial, causando um aumento do inchaço, na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e na produção de espécies reativas de oxigênio. Provavelmente, o  $\text{Fe}^{2+}$  livre ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) tenha causado estresse oxidativo mitocondrial através da interação com diferentes EROs, levando à peroxidação lipídica (FARINA et al., 2013) e oxidação dos grupos tiol de proteínas mitocondriais. Tais processos podem resultar na formação de agregados de proteína de elevado peso molecular, que são precursores de poro de transição de permeabilidade mitocondrial, contribuindo para o surgimento do inchaço (SU et al., 2011, GRINGS et al., 2014). *P. boldus* atenuou significativamente a disfunção mitocondrial induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , enquanto que boldina exibiu apenas um modesto efeito protetor. Com isto, concluímos que outros componentes também são críticos para o efeito farmacológico de *P. boldus* contra o dano mitocondrial induzido pelo  $\text{Fe}^{2+}$  do que somente o alcaloide boldina, e as propriedades farmacológicas de *P. boldus* resultam de um efeito sinérgico entre as moléculas. Para compreender melhor os mecanismos envolvidos na proteção oferecida por *P. boldus*, foi avaliada a composição química do extrato da planta, bem como, o potencial antioxidante de *P. boldus* e boldina em ensaios não biológicos. A análise da composição revelou a presença de compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes e quelantes, como por exemplo

a catequina, quercetina e rutina. O ensaio da capacidade quelante mostrou que entre os mecanismos moleculares envolvidos na proteção mitocondrial pelo extrato de *P. boldus*, está a formação de complexos redox inativos entre os polifenóis vegetais e o  $\text{Fe}^{2+}$ . A fim de obter mais informações sobre o mecanismo do efeito protetor de *P. boldus*, a capacidade scavenger de radical DPPH• e o potencial redutor do extrato e de boldina também foram avaliadas. Estes ensaios demonstraram que a doação de hidrogênio para o radical livre e sua conversão em espécie não reativa pode ser um mecanismo por meio do qual o extrato diminui os níveis de espécies reativas. Boldina, por sua vez, não quelou  $\text{Fe}^{2+}$  significativamente (dados não mostrados) e exibiu apenas um efeito modesto sobre a peroxidação lipídica e reação de Fenton. Além disso, teve um desempenho inferior nos ensaios do poder redutor e na eliminação de DPPH• do que *P. boldus*. Portanto, é possível concluir que o pequeno efeito protetor de boldina nas mitocôndrias pode estar ligado à sua conhecida capacidade antioxidante. Logo, é possível supor que, os mecanismos de proteção de *P. boldus* contra o dano oxidativo mitocondrial induzido pelo  $\text{Fe}^{2+}$  envolvem a quelação de ferro somado ao caráter antioxidante, resultado que pode refletir o efeito sinérgico de vários flavonóides e compostos fenólicos presentes no extrato. Isoladamente, a boldina parece ter uma pequena participação no efeito protetor do extrato contra o dano oxidativo induzido pelo pró-oxidante  $\text{Fe}^{2+}$ -cittrato.

O segundo estudo, que avaliou o efeito de *P. boldus* contra a toxicidade mediada por  $\text{Cu}^{2+}$ , mostrou pela primeira vez, que o extrato foi efetivo em reduzir o estresse oxidativo e as alterações neurocomportamentais (deficiências motoras) causadas por  $\text{Cu}^{2+}$  em *D. melanogaster*, um organismo modelo confiável para este estudo devido a presença de vários genes envolvidos com a homeostase de  $\text{Cu}^{2+}$ , assim como em humanos.

A exposição das moscas ao  $\text{Cu}^{2+}$  diminuiu a atividade da enzima GST, uma enzima multifuncional que desempenha um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo (MATTIE; FREEDMAN, 2004). Considerando que a conformação molecular de GST é composta de domínios ricos em cisteína, é possível sugerir que a oxidação dos grupos de tióis causada por  $\text{Cu}^{2+}$  resultou na diminuição da atividade enzimática. Além da oxidação direta,  $\text{Cu}^{2+}$  também poderia estar oxidando GSH, e indiretamente interferindo na atividade de GST por depleção de seu substrato.

Também foi constatado que a exposição das moscas ao  $\text{Cu}^{2+}$  aumentou a expressão de genes relacionados com a via de estresse oxidativo: Sod1, Cat, TrxR1 e Nrf2. Consideramos que o aumento na expressão destes genes poderia representar um mecanismo compensatório ao estresse desencadeado por  $\text{Cu}^{2+}$ , uma vez que a participação deste metal na reação de Fenton,

resulta na geração de radicais  $\text{OH}^\bullet$  e/ ou outras EROS como subproduto da reação do  $\text{Cu}^{2+}$  com peróxido de hidrogênio.

Mostramos que o co-tratamento de  $\text{Cu}^{2+}$  + *P.boldus* resultou em aumento da atividade da GST e diminuição da expressão das enzimas antioxidantes. Acreditamos que o efeito protetor de *P.boldus* esteja vinculado aos seus constituintes polifenóis, os quais possuem propriedades antioxidantes inerentes, tais como catequina e boldina. Estes compostos fenólicos diminuem a oxidação de tióis da GST e também o estresse oxidativo induzido por  $\text{Cu}^{2+}$ , levando a diminuição da expressão das enzimas antioxidantes.

A expressão gênica dos transportadores celulares de  $\text{Cu}^{2+}$ , Atp7A e Ctr1A, também foram aumentadas após tratamento das moscas com  $\text{Cu}^{2+}$ . O aumento da expressão de Atp7A pode indicar uma resposta homeostática aos altos níveis de  $\text{Cu}^{2+}$  intracelular, uma vez que esta proteína é uma ATPase do tipo P que controla o efluxo de  $\text{Cu}^{2+}$  para cuproenzimas na via secretora (FATEMI; SARKAR, 2002). Também foi possível observar que ocorreu um aumento na expressão gênica de Ctr1A, proteína transportadora responsável pela maior parte da captação de  $\text{Cu}^{2+}$ , em resposta aos altos níveis de  $\text{Cu}^{2+}$  extracelular. Apesar do tratamento com *P.boldus* ter restaurado os níveis de mRNA de Atp7A e Ctr1A; paradoxalmente, a deposição de  $\text{Cu}^{2+}$  foi aumentada em moscas simultaneamente expostas a *P.boldus* e  $\text{Cu}^{2+}$ . Consideramos que este efeito tenha sido causado pela pequena tolerância de *D. melanogaster* para se adaptar metabolicamente ao excesso de  $\text{Cu}^{2+}$ .

A exposição das moscas ao  $\text{Cu}^{2+}$  foi prejudicial à atividade neuronal, resultando em déficits locomotores demonstrados pelo teste da geotaxia negativa (escalada), corroborando com outros estudos sobre os efeitos neurocomportamentais do  $\text{Cu}^{2+}$  em moscas (DUSEK et al., 2015). Considerando que os neurônios colinérgicos, que modulam funções cognitivas e comportamentais e desempenham um papel importante na regulação da locomoção, podem ser alterados por excesso de  $\text{Cu}^{2+}$ , a atividade de AChE, uma enzima que participa da neurotransmissão colinérgica (PICCIOTTO et al., 2012), também foi testada. Nossos resultados mostram que as moscas expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$  apresentaram uma diminuição na atividade da AChE. Em contraste, a expressão gênica de Ace aumentou após exposição de *D. melanogaster* ao  $\text{Cu}^{2+}$ , provavelmente refletindo a adaptação à inibição da AChE pelo  $\text{Cu}^{2+}$ . A diminuição da atividade da AChE pode ser explicada pelo efeito do  $\text{Cu}^{2+}$  no enovelamento e agregação de proteínas. Ainda, a diminuição da atividade da AChE poderia estar associada com o déficit locomotor observado nas moscas expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$ .

De forma geral, *P. boldus* foi eficaz em atenuar os efeitos tóxicos associados ao teor de  $\text{Cu}^{2+}$  no sistema nervoso de *D. melanogaster*, através da proteção contra alterações,

locomotoras, restabelecimento da atividade da AchE e restauração da expressão gênica de Ace. Consideramos que os efeitos protetores de *P. boldus* sejam resultado do sinergismo de vários compostos polifenólicos, culminando na neutralização de radicais livres. Esta proteção oferecida pelo *P. boldus* também poderia estar relacionada com o aumento da sobrevivência das moscas expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$ .

O conjunto de resultados obtidos aqui, demonstraram, pela primeira vez, o efeito protetor de *P. boldus* na disfunção mitocondrial hepática induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , além dos efeitos benéficos sobre a toxicidade induzida por  $\text{Cu}^{2+}$  nos parâmetros aqui testados, dados importantes que contribuem para o conhecimento das propriedades farmacológicas da planta e para indicar a espécie como uma promissora terapia no tratamento de disfunções relacionadas com sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , causadas por fatores ambientais ou genéticos. Neste cenário, consideramos a atividade antioxidante e quelante do extrato de *P. boldus*, como os mecanismos envolvidos no efeito protetor desta planta. Nosso estudo também destaca o uso de *D. melanogaster* como um organismo modelo alternativo efetivo em pesquisas toxicológicas e farmacológicas.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, pode-se concluir que:

- O extrato bruto de *P. boldus* reduziu a disfunção mitocondrial induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo provável que o mecanismo de proteção esteja relacionado com a caráter antioxidante somado à capacidade do extrato em quelar  $\text{Fe}^{2+}$ .
- Boldina apresentou uma modesta proteção contra a toxicidade mitocondrial induzida por  $\text{Fe}^{2+}$ , que pode estar relacionada à sua conhecida capacidade antioxidante.
- O extrato aquoso de *P. boldus* apresentou quantidades representativas de polifenóis antioxidantes e quelantes, tais como: boldina, quercetina, rutina, ácido cafeico, catequina e kaempferol
- O extrato aquoso de *P. boldus* foi eficaz em diminuir a taxa de mortalidade de *D.melanogaster* expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$ , e reduzir os efeitos tóxicos do  $\text{Cu}^{2+}$  associados com alterações locomotoras.
- O tratamento com *P. boldus* foi eficaz em reduzir alterações na atividade da enzima GST induzidas por  $\text{Cu}^{2+}$  em *D.melanogaster*, além de restaurar a níveis basais a expressão de mRNA de genes envolvidos com vias que controlam o balanço redox das células.
- *P. boldus* restabeleceu a atividade da AchE e a diminuição na expressão gênica de Ace em *D.melanogaster* expostas ao  $\text{Cu}^{2+}$ .
- O co-tratamento com *P.boldus* atenuou o aumento da expressão dos genes dos transportadores celulares de  $\text{Cu}^{2+}$ , Atp7A e Ctr1A induzidos por  $\text{Cu}^{2+}$ , embora isto não tenha refletido em uma diminuição da deposição de  $\text{Cu}^{2+}$  em *D. melanogaster*.
- Consideramos que a proteção exercida por *P. boldus*, contra o dano hepático induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  e efeitos tóxicos causados por  $\text{Cu}^{2+}$ , convergem de sua complexa composição de forma totalitária, ou seja, de uma ação sinérgica de vários compostos polifenólicos, que permitem eficácia em reações de oxido-redução e na neutralização de radicais livres, principal mecanismo

da toxicidade destes metais, mostrando-se uma espécie promissora no tratamento de disfunções relacionadas com sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados nesta tese, estudos futuros com os seguintes objetivos poderiam ser delineados:

- Avaliar o efeito protetor de boldina contra a toxicidade do  $\text{Cu}^{2+}$ , avaliando parâmetros de estresse oxidativo e neurotoxicidade em *D. melanogaster*.
- Avaliar parâmetros de função mitocondrial em isolados mitocondriais de *D. melanogaster* expostas à  $\text{Cu}^{2+}$  e tratadas com *P. boldus*;
- Testar a contribuição dos flavonoides majoritários extraídos de *P. boldus* como quercetina, ácido cafeico e kaempferol, nas disfunções mitocondriais induzidas por ferro.
- Avaliar o efeito quelante do *P. boldus* para o metal  $\text{Cu}^{2+}$



## **DEMAIS TRABALHADOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO:**

**Klimaczewski, C. V.**, Braga, M., Barbosa, N., Rocha, J.B.T. Influence of cofactor Zn<sup>2+</sup> in the mechanism of ALA-D inhibition by heavy metals from group 10 and 11 of periodic table: *in vitro* and *in silico* studies (MANUSCRITO)

**Klimaczewski, C. V.**, Piccoli, B., Barbosa, N., Rocha, J.B.T. Copper-supplemented diet modulates oxidative stress markers in cockroach *Nauphoeta cinerea* (MANUSCRITO)

Ecker, A., Vieira, F.A., Prestes, A.S., Santos, M.M., Ramos, A., Rafael Dias Ferreira, Macedo, G.T., Klimaczewski, C.V., Seeger, R.L. Rocha, J.B.T., Barbosa, N.B.V. **Effect of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata* aqueous-leaf extracts on oxidative and mitochondrial parameters *in vitro*.** EXCLI journal, v.14, p.1219, 2015.

Adedara, I.A., Klimaczewski, C.V., Barbosa, N.B.V., Farombi, E.O., Souza, D.O. **Influence of diphenyl diselenide on chlorpyrifos-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, v. 32, p. 52-59, 2015.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBAOUI, A., HIBA, O.E., GAMRANI, H. **Neuroprotective potential of Aloe arborescens against copper induced neurobehavioral features of Parkinson's disease in rat.** Acta Histochemica, v.281 (17), p. 30111-3, 2017.
- ABOOD, W.N., FAHMI, I., ABDULLA, M.A., ISMAIL, S. **Immunomodulatory effect of an isolated fraction from *Tinospora crispa* on intracellular expression of INF- $\gamma$ , IL-6 and IL-8.** BMC complementary and alternative medicine, v.14, p. 205, 2014.
- AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism.** Nutrition. New York: v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ARCAYA, J., SALAZAR, U., MORALES, L., MONCADA, Y., BONILLA, E. **Lower sensitivity to copper toxicity in female *Drosophila melanogaster*.** Revista de Toxicologia en Linea. v.42, 2014.
- AROSIO, P., LEVI, S. **Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage.** Biochimica et Biophysica Acta. v. 1800, p. 783–792, 2010.
- AZMAT, R., MOIN, S., SALEEM, A. **Remediation of Cu metal-induced accelerated Fenton reaction by potato peels bio-sorbent.** Environmental Monitoring and Assessment. v.188(12), p.674, 2016.
- BAHAR, E., LEE, G.H., BHATTARAI, K.R., LEE, H.Y., CHOI, M.K., RASHID, H.O., KIM, J.Y., CHAE, H.J., YOON, H. **Polyphenolic Extract of *Euphorbia supina* Attenuates Manganese-Induced Neurotoxicity by Enhancing Antioxidant Activity through Regulation of ER Stress and ER Stress-Mediated Apoptosis.** International Journal of Molecular Sciences, v.18(2), 2017.
- BALAMURUGAN, K., SCHAFFNER, W. **Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope.** Biochimica and Biophysica Acta, v. 1763, p. 737–746, 2006.
- BALINT, R., SAID-PULLICINO, D., AJMONE-MARSAN, F. **Copper dynamics under alternating redox conditions is influenced by soil properties and contamination source.** Journal of Contaminant Hydrology, v. 173, p. 83–91, 2015.
- BARRAJÓN-CATALÁN, E., HERRANZ-LÓPEZ, M., JOVEN, J., SEGURA-CARRETERO, A., ALONSO-VILLAVERDE, C., MENÉNDEZ, J.A., MICOL, V. **Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties.** Advances in Experimental Medicine and Biology, v.824, p.141-59, 2014.
- BEARD, J.L., DAWSON, H., PIÑERO, D.J. **Iron metabolism: A comprehensive review.** Nutrition Reviews, v. 54, p. 295–317, 1998.
- BEINHARDT, S., LEISS, W., STATTERMAYER, A.F., GRAZIADEI, I., ZOLLER, H., STAUBER, R., MAIERON, A., DATZ, C., STEINDL-MUNDA, P., HOFER, H. **Long-term**

**outcomes of patients with Wilson disease in a large Austrian cohort.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v.12, p. 683–689, 2014.

BETTEDI, L., ASLAM, M.F., SZULAR, J., MANDILARAS, K., MISSIRLIS, F. **Iron depletion in the intestines of Malvolio mutant flies does not occur in the absence of a multicopper oxidase.** *Journal of Experimental Biology*, v. 214 (Pt 6), p. 971-8, 2011.

BHOWMIK, A., OJHA, D., GOSWAMI, D., DAS, R., CHANDRA, N. S., CHATTERJEE, T. K., CHAKRAVARTY, A., CHAKRAVARTY, S., CHATTOPADHYAY, D. **Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice.** *Biomedicine Pharmacotherapy*, v. 87, p. 443-450, 2017

BIANCHINI, M.C., GULARTE, C.O., ESCOTO, D.F., PEREIRA, G., GAYER, M.C., ROEHRS, R., SOARES, F.A., PUNTEL, R.L. ***Peumus boldus* (Boldo) aqueous extract present better protective effect than boldine against manganese-induced toxicity in *D. melanogaster*.** *Neurochemical Research*, v. 41(10), p. 2699-2707, 2016.

BIRT, D.F., HENDRICH, S., WANG, W. **Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids.** *Pharmacology & Therapeutics*, v.90, p. 157-177, 2001.

BODENSTEINER, J. B. **Friedreich Ataxia.** *Seminars in Pediatric Neurology*, v.21, p. 72, 2014.

BLEACKLEY, M.R., MACGILLIVRAY, R.T. **Transition metal homeostasis: from yeast to human disease.** *Biometals*, v. 24, p. 785–809, 2011.

BRIKI, M., JI, H., LI, C., DING, H., GAO, Y. **Characterization, distribution, and risk assessment of heavy metals in agricultural soil and products around mining and smelting areas of Hezhang, China.** *Environmental Monitoring and Assessment*, v.187, p. 767, 2015.

CANÇADO, R. D., CHIATTONE, C.S. **Current approach to hereditary hemochromatosis.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32(6), p. 469-475, 2010.

CAPPELLINI, M.D., COHEN, A.R., ELEFThERIOU, A. **Guidelines for the clinical management of thalassemia.** 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2008.

CASSELS, B.K., SPEISKY, H. **Disefio de metodos para la obtencion de boldina y glaucina a partir de1 boldo para su use en la industria farmaceutica y de alimentos.** Informe tecnico FONTEC. diciembre de 1991.

CHENG, Z., LEE, L., DAYAN, S., GRINSHTein, M., SHAW, R. **Speciation of heavy metals in garden soils: evidences from selective and sequential chemical leaching.** *Journal of Soils Sediments*, v. 11, p. 628–638, 2011.

CHERRAK, S.A., MOKHTARI-SOULIMANE, N., BERROUKECHE, F., BENSENANE, B., CHERBONNEL, A., MERZOUK, H., ELHABIRI, M. ***In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: a structure-activity investigation.** *PLoS One*, v.11(10), p. e0165575, 2016.

DONALDSON, K., POLAND, C. A. **Inhaled nanoparticles and lung cancer—what we can learn from conventional particle toxicology.** *Swiss Medical Weekly*, v.142, p. 13547, 2012.

DROCHIOIU, G., ION, L., CIOBANU, C., HABASESCU, L., MANGALAGIU, I. **Letter: Mass spectrometric approach of high pH- and copper-induced glutathione oxidation.** *European Journal of Mass Spectrometry*, v.19(1), p. 71-5, 2013.

DU, X., XU, H., JIANG, H., XIE, J. **Akt/Nrf2 activated upregulation of heme oxygenase-1 involves in the role of Rg1 against ferrous iron-induced neurotoxicity in SK-N-SH cells.** *Neurotoxicity Research*, v. 24(1), p. 71-9. 2013.

DUMAN, F., OCSOY, I., KUP, F. O. **Chamomile flower extract-directed CuO nanoparticle formation for its antioxidant and DNA cleavage properties.** *Materials Science and Engineering C*, v.60, p. 333–338, 2016.

DUSEK, P., ROOS, P.M., LITWIN, T., SCHNEIDER, S.A., FLATEN, T.P., AASETH, J. **The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 3, p.193-203, 2015.

DUTTA, M., GHOSH, A. K., MISHRA, P., JAIN, G., RANGARI, V., CHATTOPADHYAY, A., DAS, T., BHOWMICK, D., BANDYOPADHYAY, D. **Protective effects of piperine against copper ascorbate induced toxic injury to goat cardiac mitochondria *in vitro*.** *Food & Function*, v.5, p. 2252, 2014.

FALÉ, P.L., AMARAL, F., AMORIM, M.P.J., SILVA., S.M., FLORÊNCIO M.H., FRAZÃO, F.N., SERRALHEIRO, M.L. **Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 50(8), p. 2656-62, 2012.

FALFUSHYNSKA, H.I., GNATYSHYNA, L.L., STOLIAR, O.B., NAM, Y.K. **Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus gibelio* from two populations.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. v.154 (3), p. 242-53, 2011.

FARINA, M., AVILA, D. S., ROCHA, J.B.T, ASCHNER, M. **Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury.** *Neurochemistry International*, v.62(5), p.575–594, 2013.

FATEMI, N.; SARKAR, B. **Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease.** *Environmental Health Perspectives*. v. 110, p. 695–698, 2002.

FERNÁNDEZ, J., LAGOS, P., RIVERA, P., ZAMORANO-PONCE, E. **Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver.** *Phytotherapy Research*, v. 23, p. 1024–1027, 2009.

FIELDS, M., LEWIS, C.G., LURE, M.D. **The role of the adrenals in copper deficiency.** *Metabolism*, v. 40(5), p. 540-4. 1991.

FINBERG, K.E. **Unraveling mechanisms regulating systemic iron homeostasis.** *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, p. 532–537, 2011.

FUJIWARA, T., HARIGAE, H. **Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia.** *Pediatrics International*, 55(6):675-9 (2013)

GAGGELLI, E., KOZLOWSKI, H., VALENSIN, D., VALENSIN, G. **Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis).** *Chemical Reviews*, v.106 (6), p.1995-2044, 2006.

GEORGATSOU, E., MAVROGIANNIS, L.A., FRAGIADAKIS, G. S. & ALEXANDRAKI, D. **The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 2, 72, p. 13786–13792, 1997.

GHATE, N.B., CHAUDHURI, D., PANJA, S., MANDAL, N. **Nerium indicum leaf alleviates iron-induced oxidative stress and hepatic injury in mice.** *Pharmaceutical Biology*, v. 53(7), p.1066-74, 2015.

GRINGS, M., MOURA, A.P., AMARAL, A.U., PARMEGGIANI, B., GASPAROTTO, J., MOREIRA, J.C., GELAIN, D.P., WYSE, A.T., WAJNER, M., LEIPNITZ, G. **Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification.** *Biochimica and Biophysica Acta*. v. 842(9), p. 1413-22. 2014.

GRISSA, I., EZZI, L., CHAKROUN, S., MABROUK, A., SALEH, A.B., BRAHAM, H., HAOUAS, Z., CHEIKH, H.B. **Rosmarinus officinalis L. ameliorates titanium dioxide nanoparticles and induced some toxic effects in rats' blood.** *Environmental Science and Pollution Research*, v.13, p.12474-12483, 2017.

GROPPER, S.S., SMITH, J.L. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**, 5th ed., p. 481. 2013.

GROSSKOPF, H.M., GROSSKOPF, R.K., BIAZUS, A.H., LEAL, M.L., BOTTARI, N.B., ALVES, M.S., SCHETINGER, M.R., MORSCH, V.M., MACHADO, G., BALDISSERA, M.D., DA SILVA, A.S. **Supplementation with copper edetate in control of Haemonchus contortus of sheep, and its effect on cholinesterase's and superoxide dismutase activities.** *Experimental Parasitology*, v. 173, p. 34-41. 2017.

GROTTO, H.Z.W. **Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 30, p. 390-397, 2008.

HALL, A.C., YOUNG, B.W., BREMNER, I. **Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.11 (1), p. 57-66, 1979.

HALLIWELL B. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** *Journal of Neurochemistry*, v.59, p.1.609-23, 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 246, p. 501-14. 1986.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** Methods in Enzymology, v.186, p.1-85, 1990.

HARRIS, Z. L., KLOMP, L. W. & GITLIN, J. D. **Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis.** The American Journal of Clinical Nutrition. v. 67, p. 972S–977S, 1998.

HASAN, N.M., LUTSENKO, S. **Regulation of copper transporters in human cells.** Current Topics in Membranes, v. 69(5), p. 137-61, 2012.

HASSETT, R., DIX, D.R., EIDE, D.J., KOSMAN, D.J. **The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*.** Biochemical Journal, v.2, p. 477-84, 2000.

HAVERROTH, G.M.B., WELANG, C., MOCELIN, R.N., POSTAY, D., BERTONCELLO, K.T., FRANSCESCON, F., ROSEMBERG, D.B., DAL MAGRO, J., DALLA CORTE, C.L. **Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 122, 2015, p. 440-447, 2015.

HERRERA, M.A., JARA, G.P., VILLARROEL, R., ALIAGA, A.E., GÓMEZ-JERIA, J.S., CLAVIJO, E., GARRIDO, C., AGUAYO, T., VALLETTE, M.M.C. **Surface enhanced Raman scattering study of the antioxidant alkaloid boldine using prismatic silver nanoparticles.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.133, p. 591-6. 2014.

HIRTH, F. ***Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration.** CNS & Neurological Disorders-Drug Targets, v. 9, p. 504-523, 2010.

HUA, H., GEORGIEV, O., SCHAFFNER, W., STEIGER, D. **Human copper transporter Ctr1 is functional in *Drosophila*, revealing a high degree of conservation between mammals and insects.** Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 15(1), p. 107-113, 2010.

HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., ZHANG, Y. **Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention.** Nutrition and Cancer, v. 62(1), p. 1-20, 2010.

HUGUENOT, D., BOIS, P., JÉZÉQUEL, K., CORNU, J.Y., LEBEAU, T. **Selection of low cost materials for the sorption of copper and herbicides as single or mixed compounds in increasing complexity matrices.** Journal of Hazardous Materials, v.182, p. 18–26, 2010.

HWANG, J.E.C., BRUYNE, M., WARR, C.G., BURKE, R. **Copper overload and deficiency both adversely affect the central nervous system of *Drosophila*.** Metallomics, v.6, p. 2223, 2014.

JANG, Y.Y., SONG, J.H., SHIN, Y.K., HAN, E.S., LEE, C.S. **Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Pharmacological Research*, v.42, p. 361–371, 2000.

JIANG, J., QIN, C., SHU, X., CHEN, R., SONG, H., LI, Q., XU, H. **Effects of copper on induction of thiol-compounds and antioxidant enzymes by the fruiting body of *Oudemansiella radicata*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.111, p. 60-5, 2015.

JIANG, W.D., LIU, Y., HU, K., JIANG, J., LI, S., LIN FENG, L., ZHOU, X. **Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol.** *Aquatic Toxicology*, v. 155, p. 301-313, 2014.

JIANG, W.D., LIU, Y., JIANG, J., WU, P., FENG, L., ZHOU, X.Q. **Copper exposure induces toxicity to the antioxidant system via the destruction of Nrf2/ARE signaling and caspase-3-regulated DNA damage in fish muscle: amelioration by myo-inositol.** *Aquatic Toxicology*, v.159, p. 245-55. 2015

JIMÉNEZ, I., GARRIDO, A., BANNACH, R., GOTTELAND, M., SPEISKY, H. **Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis.** *Phytotherapy Research*, v.14, p. 339–343.

JOMOVA, K., VALKO, M. **Advances in metal-induced oxidative stress and human disease.** *Toxicology*, v. 283, p. 65-87, 2011.

KHALILI, M., FATHI, H., EBRAHIMZADEH, M.A. **Antioxidant activity of bulbs and aerial parts of *Crocus caspius*, impact of extraction methods.** *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29(3), p. 773-7, 2016.

KOHGO, Y., IKUTA, K., OHTAKE, T., TORIMOTO, Y., KATO, J. **Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload.** *International Journal of Hematology*, v. 88, p. 7–15, 2008.

KOKOTKIEWICZ, A., JAREMICZ, Z., LUCZKIEWICZ, M. **Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine.** *Journal of Medicinal Food*, v. 13(2), p. 255-69, 2010.

KONTOGHIORGHE, C.N., KOLNAGOU, A., KONTOGHIORGHES, G.J. **Phytochelators Intended for Clinical Use in Iron Overload, Other Diseases of Iron Imbalance and Free Radical Pathology.** *Molecules*, v.20 (11), p. 20841-72, 2015.

KOPPENOL, W.H. **The Haber-Weiss cycle—70 years later.** *Redox Report*, v. 6(4), p. 229-34, 2001.

KOROTKOV, E.A., SM, SARIS, S.M. ***In vitro* modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: a comparison of copper and mercury with cadmium.** *J Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.25 Suppl 1:bS63-73, 2011.

KRINGSTEIN, P., CEDERBAUM, A.I. **Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1.** Free Radical Biology & Medicine, v.18, p. 559-563, 1995.

KRISHNAMURTHY, P., XIE, T., SCHUETZ, J.D. **The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis.** Pharmacology & Therapeutics, v. 114(3), p. 345-58. 2007.

KUBÍNOVÁ, R., MACHALA, M., MINKSOVÁ, K., NECA, J., SUCHÝ, V. **Chemoprotective activity of boldine: modulation of drug-metabolizing enzymes.** v. 56(3), p. 242-3, 2001.

LANE, D.J.R., MERLOT, A.M., HUANG, M.L.-H., BAE, D.-H., JANSSON, P.J., SAHNI, S., KALINOWSKI, D.S. RICHARDSON, D.R. **Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease.** Neurochemistry International v. 62, p. 575–594, 2013.

LANG, M., BRAUN, C.L., KANOST, M.R., GORMAN, M.J. **Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in *Drosophila melanogaster*.** Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 109(33), p. 13337–13342, 2012.

LANHERS, M.C., JOYEUX, M., SOULIMANI, R., FLEURENTIN, J., SAYAG, M., MORTIER, F., YOUNOS, C., PELT, J.M. **Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*.** Planta Medica, v. 57(2), p. 110-5, 1991.

LLOYD, R. V., HANNA, P. M., MASON, R. P. **The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction.** Free Radical Biology and Medicine, v. 22, p. 885-8, 1997.

LAU, Y.S., TIAN, X.Y., HUANG, Y., MURUGAN, D., ACHIKE, F.I., MUSTAFA, M.R. **Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism.** Biochemical Pharmacology, v. 85(3), p. 367-75, 2013.

LEVI, S., ROVIDA, E. **The role of iron in mitochondrial function.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1790, p. 629–636, 2009.

LINDER, M. C. & HAZEGH-AZAM, M. **Copper biochemistry and molecular biology.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 63, p. 797S–811S, 1996.

LIOCHEV, S.L. **The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production.** Free Radical Research. v. 25(5), p. 369-84, 1996.

LIONETTO, M.G., CARICATO, R., CALISI, A., GIORDANO, M.E., SCHETTINO, T. **Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives.** BioMed Research International. v.2013, p.321213, 2013.



- LIU, Y., LIU, H., LIU, S., WANG, S., JIANG, R.J., LI, S. **Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 71(1), p.16-30, 2009.
- LUSHCHAK, V.I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.** Chemico-Biological Interactions, v. 224, p.164-75, 2014.
- LUTSENKO, S.; EFREMOV, R.G.; TSIVKOVSKI, R.; WALKER, J.M. **Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): Biochemical properties and regulation.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes. v.34, p. 351–362, 2002.
- LUTSENKO, S.; TSIVKOVSKII, R.; WALKER, J.M. **Functional properties of the human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) and regulation by metallochaperone Atox1.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 986, p.204–211, 2003.
- MALLYA, R., CHATTERJEE, P.K., VINODINI, N.A., CHATTERJEE, P., MITHRA, P. **Moringa oleifera Leaf Extract: Beneficial Effects on Cadmium Induced Toxicities - A Review.** Journal of Clinical and Diagnostic Research, v.4, p. CE01-CE04, 2017.
- MANDEL, S., AMIT, T., BAR-AM, O., YODIM, M.B. **Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents.** Progress in Neurobiology, v.82 (6), p. 348-60, 2007.
- MARKLUND, S.L., ANDERSEN, P.M., FORSGREN, L., NILSSON, P., OHLSSON, P.I., WIKANDER, G., OBERG, A. **Normal binding and reactivity of copper in mutant superoxide dismutase isolated from amyotrophic lateral sclerosis patients.** Journal of Neurochemistry, v.69 (2), p.675-81, 1997.
- MARSELLA, M., BORGNA-PIGNATTI, C. **Transfusional iron, overload and iron, chelation therapy in thalassemia, major and sickle cell disease.** Hematology/Oncology Clinics of North America, v.28, p. 703–727. 2014.
- MASAKA, J., MUUNGANIRWA, M. **The effects of copper oxy chloride waste contamination on selected soil biochemical properties at disposal site.** Science of the Total Environment, v. 387(1-3), p. 228-36. 2007.
- MATTIE, M.D, FREEDMAN, J.H. **Copper-inducible transcription: regulation by metal and oxidative stress-responsive pathways.** American Journal of Physiology. V. 286(2), p. C293-301, 2004
- MCGURK, L., BERSON, A., BONINI, N.M. **Drosophila as an *in vivo* Model for Human Neurodegenerative Disease.** Genetics, v.201 (2), p. 377-402, 2015.
- MCKAY, D.L., BLUMBERG, J.B. **A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.).** Phytotherapy Research, v. 20(7), p. 519-30, 2006.
- MENA, N.P., URRUTIA, P.J., LOURIDO, F., CARRASCO, C.M., NÚÑEZ, M.T. **Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders.** Mitochondrion, v. 21, p. 92-105, 2015.

MLADĚNKA, P., MACÁKOVÁ, K., FILIPSKÝ, T., ZATLOUKALOVÁ, L., JAHODÁŘ, L., BOVICELLI, P., SILVESTRI, I.P., HRDINA, R., SASO, L. **In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.105 (5), p.693-701, 2011.

MOJARRAB, M., SOLTANI R, ALIABADI A. **Pyridine Based Chalcones: Synthesis and Evaluation of Antioxidant Activity of 1-Phenyl-3-(pyridin-2-yl)prop-2-en-1-one Derivatives.** Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, v.8 (3), p.125-30, 2013.

MONEIM, A. E. A., BAUOMY, A. A., DIAB, M. M. S., SHATA, M. T. M., AL-OLAYAN, E. M., EL-KHADRAGY, M. F. **The Protective Effect of hysalis peruviana L. Against Cadmium-Induced Neurotoxicity in Rats.** Biological Trace Element Research, v.160, p. 392–399, 2014.

MORALES P, VARGAS R, VIDELA LA, FERNÁNDEZ V. **Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol.** Food & Function, 2014, 5(2):243-50.

MUSACCO-SEBIO, R., FERRAROTTI, N., SAPORITO-MAGRINA, C. **Oxidative damage to rat brain in iron and copper overloads.** Metallomics, v.6, p. 1410–1416, 2014.

MUTHNA, D., CMIELOVA, J., TOMSIK, P., REZACOVA, M. **Boldine and related aporphines: from antioxidant to antiproliferative properties.** Natural Product Communications, v.8 (12), p. 1797-800, 2013.

NANAYAKKARA, G., ALASMARI, A., MOULI, S., ELDOUMANI, H., QUINDRY, J., MCGINNIS, G., FU, X., BERLIN, A., PETERS, B., ZHONG, J., AMIN, R. **Cardioprotective HIF-1 $\alpha$ -frataxin signaling against ischemia-reperfusion injury.** American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 309(5), p. H867-79, 2015

NANNEPAGA, J. S., KORIVI, M., TIRUMANYAM, M., BOMMAVARAM, M., KUO, C. **Neuroprotective Effects of *Bacopa monniera* Whole-Plant Extract against Aluminum-Induced Hippocampus Damage in Rats: Evidence from Electron Microscopic Images.** Chinese Journal of Physiology, v.57 (5), p. 279-285, 2014.

NARAYANA, K.R., REDDY, M.S., CHALUVADI, M.R., KRISNA, D.R. **Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential.** Indian Journal of Pharmacology, v. 33, p. 2–16, 2001.

NISKA, K., SANTOS-MARTINEZ, M.J., RADOMSKI, M.W., INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. **CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin.** Toxicology in Vitro, v. 29, p. 663–671, 2015.

NYASAE, L., BUSTOS, R., BRAITERMAN, L., EIPPER, B., HUBBARD, A. **Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites.** Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 292, p. G1181–G1194, 2007.

NORGATE, M., SOUTHON, A., ZOU, S., ZHAN, M., SUN, Y., BATTERHAM, P., CAMAKARIS, J. **Copper homeostasis gene discovery in *Drosophila melanogaster***. *Biometals*, v. 20(3-4), p. 683-97, 2007.

O'BRIEN, P., CARRASCO-POZO, C., SPEISKY, H. **Boldine and its antioxidant or health-promoting properties**. *Chemico-Biological Interactions*, v.159, p.1–17, 2006.

O'DONOHUE, J.W., REID, M.A., VARGHESE, A., PORTMANN, B., WILLIAMS, R. **Micronodular cirrhosis and acute liver failure due to chronic self-intoxication**. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v.5, p. 561-562. 1993.

OLIVARES, M., PIZARRO, F., SPEISKY, H. **Copper in Infant Nutrition: Safety of World Health Organization Provisional Guideline Value for Copper Content of Drinking Water**. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.26, p. 251-257, 1998.

PANTOPOULOS K, PORWAL SK, TARTAKOFF A, DEVIREDDY L. **Mechanisms of mammalian iron homeostasis**. *Biochemistry*, v. 51, p. 5705–5724, 2012.

PAPANIKOLAOU, G. SAMUELS, M.E., LUDWIG, E.H. **Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis**. *Nature Genetics*, v. 36, p. 77–82, 2004.

PARISER, A.R., GAHL, W.A. **Important role of translational science in rare disease innovation, discovery, and drug development**. *Journal of General Internal Medicine*, v. 29, Suppl 3:S804-7. 2014.

PEÑA, M.M., LEE, J., THIELE, D.J. **A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution**. *The Journal of Nutrition*, v.7, p. 1251-60, 1999.

PICCIOTTO, M.R., HIGLEY, M.J., MINEUR, Y.S. **Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior**. *Neuron - Cell Press*, v.76(1), p. 116-29, 2012.

POHANKA, M. **Copper, aluminum, iron and calcium inhibit human acetylcholinesterase *in vitro***. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37 (1), p. 455–459, 2014.

PONKA, P. **Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells**. *Blood*, v. 89(1), p. 1-25, 1997.

POWELL, L.W., SECKINGTON, R.C., DEUGNIER, Y. **Haemochromatosis**. *Lancet*, v. 388 (10045), p. 706-16, 2016.

PROHASKA, J.R., GYBINA, A.A. **Intracellular copper transport in mammals**. *The Journal of Nutrition*. v. 134, p.1003-6, 2004.

RENSING, C., MCDEVITT, S.F. **The copper metallome in prokaryotic cells**. *Metal Ions in Life Sciences*, v. 12, p.417-50, 2013.

ROBERTS, E.A. **Wilson's disease**. *Medicine*, v.39, p. 602–604, 2011.

ROBERTS, E.A.; SCHILSKY, M.L. **A practice guideline on Wilson disease.** *Hepatology*. v. 37, p. 1475–1492, 2003.

ROTILO, G., CARRÌ, M. T., ROSSI, L., CIRIOLO, M. R. **Copper-Dependent Oxidative Stress and Neurodegeneration.** *Life*, v.50, p. 309–314, 2000.

RUIZ, A.L.T.G., TAFFARELLO, D., SOUZA, V.H.S., CARVALHO, J.E. **Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 295–300, 2008.

RYTER, S.W., TYRRELL, R.M. **The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 28(2), p. 289-309. 2000.

SANTANAM, N., PENUMETCHA, M., SPEISKY, H., PARTHASARATHY, S. **A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR(-/-) mice.** *Atherosclerosis*, v.73(2), p. 203-10. 2004.

SANTOS, N.C., CASTILHO, R.F., MEINICKE, A.R., HERMES-LIMA, M. **The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate.** *European Journal of Pharmacology*. v.428(1), p. 37-44, 2001.

SAPORITO-MAGRIÑÁ, C., MUSACCO-SEBIO, R., ACOSTA, J.M., BAJICOFF, S., PAREDES-FLEITAS, P., REYNOSO, S., BOVERIS, A., REPETTO, M.G. **Copper(II) and iron(III) ions inhibit respiration and increase free radical-mediated phospholipid peroxidation in rat liver mitochondria: Effect of antioxidants.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.19, p. 94-99, 2017.

SARRIA, A.L., VILELA, A.F., FRUGERI, B.M., FERNANDES, J.B., CARLOS, R.M., DA SILVA M.F., CASS, Q.B., CARDOSO, C.L. **Copper (II) and zinc (II) complexes with flavanone derivatives: Identification of potential cholinesterase inhibitors by on-flow assays.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.164, p. 141–149, 2016.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RODRIGUEZ, J.A., THEODULOZ, C., ASTUDILLO, S.L., FERESIN, G.E., TAPIA, A. **Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol (Boldo).** *Free Radical Research*, v. 37, p. 447–452, 2003.

SCHWARZENBACH, R. P., EGLI, T., HOFSTETTER, T. B., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B. **Global Water Pollution and Human Health.** *Annual Review of Environment and Resources*, v.35, p.109–136, 2010.

SEKINE, S., ITO, K., WATANABE, H., NAKANO, T., MORIYA, K., SHINTANI, Y., FUJIE, H., TSUTSUMI, T., MIYOSHI, H., FUJINAGA, H., SHINZAWA, S., KOIKE, K., HORIE, T. **Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.282 (3), p. 237-43, 2015.

SENIOW, J.; MROZIAK, B.; CZLONKOWSKA, A.; JEDRYKA-GORAL, A. **Self-rated emotional functioning of patients with neurological or asymptomatic form of Wilson's disease.** *Journal of Clinical Neuropsychology*, v.17, p.367–373, 2004.

SILVA-GOMES, S., SANTOS, A.G., CALDAS, C., SILVA, C.M., NEVES, J.V., LOPES, J., CARNEIRO, F., RODRIGUES, P.N., DUARTE, T.L. **Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death.** *Journal of Hepatology*, v. 60(2), p. 354-61, 2014.

SIMIRGIOTIS, M.J., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. **Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 443–449, 2010.

SIMÕES, C., SCHENKEL, E., GOSMANN, G., MELLO, J., MENTZ, L., PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000.

SIVERTSEN, T. **Copper-induced GSH depletion and methaemoglobin formation in vitro in erythrocytes of some domestic animals and man. A comparative study.** *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*. v. 46(2), p. 121-6, 1980.

SMITH, C.L., STEELE, J.E., STAUBER, J.L., JOLLEY, D.F. **Copper-induced changes in intracellular thiols in two marine diatoms: *Phaeodactylum tricornutum* and *Ceratoneis closterium*.** *Aquatic Toxicology*, v.156, p. 211-20, 2014.

SONG, M.O., MATTIE, M.D., LEE, C.H., FREEDMAN, J.H. **The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription.** *Experimental Cell Research*, v. 322(1), p. 39-50, 2014.

SOTO, C., CABALLERO, E., PÉREZ, E., ZÚÑIGA, M.E. **Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 92, p. 3328-333. 2014.

SOUTHON, A., BURKE, R., CAMAKARIS, J. **What can flies tell us about copper homeostasis?** *Metallomics*, v. 5, p. 1346, 2013.

SOUTHON, A., FARLOW, A., NORRIDGE, M., BURKE, R., CAMAKARIS, J. **Malvolio is a copper transporter in *Drosophila melanogaster*.** *Journal of Experimental Biology*, v. 211(Pt 5), p. 709-16, 2008.

SOUTHON, A., GREENOUGH, M.A., GANIO, G., BUSH, A.I., BURKE, R., CAMAKARIS, J. **Presenilin promotes dietary copper uptake.** *PLoS One*, v. 8(5), p. e62811, 2013.

SPEISKY, H., CASSELS, B.K. **Boldo and boldine: an emerging case of natural drugdevelopment.** *Pharmacological Research*, v. 29, p. 1–12, 1994.

SU, R., WANG, R., CAO, H., PAN, J., CHEN, L., LI, C., SHI, D., TANG, Z. **High copper levels promotes broiler hepatocyte mitochondrial permeability transition in vivo and in vitro.** *Biological Trace Element Research*, v.144(1-3), p. 636-46, 2011.

SUN, T., YAN, Y., ZHAO, Y., GUO, F., JIANG, C., SRINIVASULA, S. M. **Copper Oxide Nanoparticles Induce Autophagic Cell Death in A549 Cells.** PLoS One, v.7, p. e43442, 2012.

THEIL, E.C., CHEN, H., MIRANDA, C. **Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments.** The Journal of Nutrition, v. 142, p. 478–483, 2012.

TURNLUND, J.L., KEYS, W.R., ANDERSON, H.L., ACORD, L.L. **Copper resorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope  $^{65}\text{Cu}$ .** The American Journal of Clinical Nutrition, 49: 870-878, 1989.

TURNLUND, J.R. **Human whole-body copper metabolism.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 67, p. 960s-964s, 1998.

UGUR, B., CHEN, K., BELLEN, H.J. **Drosophila tools and assays for the study of human diseases.** Disease Models & Mechanisms, v. 9(3), p. 235-44, 2016.

WAGGONER, D. J., BARTNIKAS, B. T., AND GITLIN, J. D. **The role of copper in neurodegenerative disease.** Neurobiological Disorders, v.6, p.221–230, 1999.

WANG, B., FENG, L., JIANG, W.D., WU, P., KUANG, S.Y., JIANG, J., TANG, L., TANG, W.N., ZHANG, Y.A., LIU, Y., ZHOU, X.Q. **Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine.** Aquatic Toxicology, v.158, p.125-37. 2015

WANG, C.Y., BABITT, J.L. **Hepcidin regulation in the anemia of inflammation.** Current opinion hematology, v. 23, p. 189–197, 2016.

WANG, J., PANTOPOULOS, K. **Regulation of cellular iron metabolism.** Biochemical Journal, v. 434, p. 365–381. 2011.

WANG, X.J., HAYES, J.D., HIGGINS, L.G., WOLF, C.R., DINKOVA-KOSTOVA, A.T. **Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones.** Chemistry & Biology, v.17(1), p.75-85, 2010.

WEBER, K.A., ACHENBACH, L.A., COATES, J.D. **Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction.** Nature Reviews Microbiology, v. 4, p. 752–764, 2006.

WEE, N.K., WEINSTEIN, D.C., FRASER, S.T., ASSINDER, S.J. **The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. v. 5, p. 960-3. 2013.

WEISS, K.H., THURIK, F., GOTTHARDT, D.N., SCHÄFER, M., TEUFEL, U., WIEGAND, F., MERLE, U., FERENCI-FOERSTER, D., MAIERON, A., STAUBER, R., ZOLLER, H., SCHMIDT, H.H., REUNER, U., HEFTER, H., TROCELLO, J.M., HOUWEN, R.H., FERENCI, P., STREMMEL, W., EUROWILSON Consortium. **Efficacy and safety of oral**

**chelators in treatment of patients with Wilson disease.** *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v.11(8), p.1028-35.e1-2, 2013.

WHITE, A.R., CAPPAL, R. **Neurotoxicity from glutathione depletion is dependent on extracellular trace copper.** *Journal of Neuroscience Research*. v.71(6), p. 889-97, 2003.

WHITWORTH, A.J., WES, P.D., PALLANCK, L.J. **Drosophila models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease.** *Drug Discovery Today*, v.11, p.119-126, 2006.

WIGGELINKHUIZEN, M., TILANUS, M.E., BOLLEN, C.W., HOUWEN, R.H. **Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 29(9), p. 947-58, 2009.

WILSON, S.A.K. **Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of liver.** *Brain*, v.34, p.295–507, 1912.

WINTERBOURN, C.C. **Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction.** *Toxicology Letters*, v. 82-83, p. 969-74, 1995.

WOODS, J.S., CALAS, C.A. **Iron stimulation of free radical-mediated porphyrinogen oxidation by hepatic and renal mitochondria.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.160(1), p. 101-8, 1989.

YU, Y., WANG, H, LI, Q., WANG, B., YAN, Z., DING, A. **Exposure Risk of Rural Residents to Copper in the Le'an River Basin, Jiangxi Province, China.** *Science of the Total Environment*, v. 548, p. 402–407, 2016.

ZHAO, Y., ZHAO, K., JIANG, K., TAO, S., LI, Y., CHEN, W., KOU, S., GU, C., LI, Z., GUO, L., WHITE, W.L., ZHANG, K.X. **A Review of Flavonoids from Cassia Species and their Biological Activity.** *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 17(13), p.1134-1146, 2016.

ZHOU, H., CADIGAN, K.M., THIELE, D.J. **A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278 (48), p. 48210-8, 2003.

ZIMBREAN, P.C.; SCHILSKY, M.L. **Psychiatric aspects of Wilson disease: A review.** *General Hospital Psychiatry*, v. 36, p. 53–62, 2014.