

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 04/11/2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

André Ferreira de Camargo

Análise de transcriptomas e metabolomas de *Drosophila melanogaster* expressando a oxidase alternativa mitocondrial

São José do Rio Preto
2021

André Ferreira de Camargo

Análise de transcriptomas e metabolomas de *Drosophila melanogaster*
expressando a oxidase alternativa mitocondrial

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Área de Concentração – Genética e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - Proc. 88882.434433/2019-01

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto
2021

C172a Camargo, André Ferreira de
Análise de transcriptomas e metabolomas de *Drosophila melanogaster* expressando a oxidase alternativa mitocondrial / André Ferreira de Camargo. -- São José do Rio Preto, 2021
124 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Marcos Túlio de Oliveira

1. Genética animal. 2. Drosófila. 3. Membranas mitocondriais. 4. Transcriptome. 5. Aminoácidos na nutrição. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

André Ferreira de Camargo

Análise de transcriptomas e metabolomas de *Drosophila melanogaster* expressando a oxidase alternativa mitocondrial

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Área de Concentração – Genética e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - Proc. 88882.434433/2019-01

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Tulio de Oliveira
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / UNESP/Câmpus de Jaboticabal
Orientador

Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. Luciane Carla Alberici
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / UNESP/Câmpus de Jaboticabal

Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / UNESP/Câmpus de Jaboticabal

São José do Rio Preto
04 de novembro de 2021

A Deus, que nunca me desamparou. Aos meus pais e minha maravilhosa família que sempre me apoiaram. A todos de nosso grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me possibilitado essa oportunidade na minha vida e ser cercado de pessoas maravilhosas ao meu redor. Sou eternamente grato!

Aos meus pais, irmãs e irmão por todo apoio, força, presença e amor imensurável de sempre.

A minha família por todo amor e alegria que me proporcionam, me revigorando para as novas etapas.

Ao meu orientador Prof. Marcos Túlio. Obrigado pela orientação e presença ao longo desse processo. Sou muito grato por todo crescimento que tive nesse período, intelectual e pessoalmente. Obrigado pela honestidade de sempre. Obrigado pela paciência, insistência e cuidado nos momentos de dificuldade. Obrigado por ter me possibilitado experiências únicas, desde me divertir com bioquímica até sair do país.

Ao PPG em Biociências pela oportunidade e por todo suporte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Proc. 88882.434433/2019-01 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – JP Proc. 2014/02253-6, às quais agradeço.

À toda a equipe do laboratório de Biologia Mitocondrial, aos que passaram e aos que estão, meus sinceros agradecimentos a todos vocês por todo aprendizado e crescimento que me possibilitaram. Me sinto absolutamente abençoado por ter tido a graça de trabalhar e compartilhar com vocês tanto tempo da minha vida. Cada um de vocês me ensinou muito.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório que contribuíram diretamente nos experimentos ligados a esse trabalho, sem poupar esforços e sempre de maneira brilhante, Geovana S. Garcia, Marina M. Chioda, Murilo F. Othonicar, Ailton A. Martins e Gabriel Hayshidi.

Aos meus amigos por todo cuidado, presença, ação, riso, lágrima, abraço e presença, mesmo à distância. Gratidão. Meus mais profundos agradecimentos às minhas colegas de laboratório e amigas para a vida Ana P. C. Rodrigues, Geovana S. Garcia e Marina M. Chioda e ao meu amigo Ailton A. Martins. Amo-vos imensamente. Obrigado por tudo, por todo o apoio, força, cuidado, afeto. Eternamente grato a Deus por ter tido amigos como vocês durante essa etapa que nos molda ainda mais para a vida. Vocês foram essenciais nessa minha caminhada. Obrigado.

À Dra. Hellen Penha por toda dedicação e atenção em me ensinar a técnica de extração de RNA.

À Dra. Camila Fernandes por todo suporte.

Ao Prof. Daniel Pinheiros por todo o suporte. À sua aluna Michele por todo auxílio.

Aos Drs. Howard Jacobs e Eric Dufour que me receberam na Finlândia, a Dra. Sina Saari pelas lembranças e parceria e a toda equipe, pela hospitalidade.

Ao Grupo de Oração Universitário (GOU) por todos os momentos especiais.

Aos irmãos e irmãs de consideração da rep. TK por todo apoio.

A Nicole e a Mari, que dividem comigo e tornam mais suaves as etapas finais do trabalho.

"A função da educação é ensinar a pessoa a pensar intensamente e a pensar criticamente. [...] Inteligência mais caráter - esse é o objetivo da verdadeira educação"
(KING JR., 1947)

RESUMO

Apesar dos efeitos benéficos mostrados quando a oxidase alternativa mitocondrial (AOX) de *Ciona intestinalis* (Tunicata: Ascidiacea) é expressa xenotopicamente em modelos de mamíferos e de insetos, resultados prejudiciais importantes também foram relatados, levantando preocupações quanto à sua implantação como uma futura enzima terapêutica voltada a doenças mitocondriais humanas. Por causa de sua atividade de oxidase terminal não-bombeadora de prótons, AOX pode contornar o segmento do citocromo c da cadeia respiratória e aliviar a possível sobrecarga de elétrons que ocorre após disfunção da fosforilação oxidativa (OXPHOS), não contribuindo, porém, para a força próton-motriz necessária à síntese de ATP mitocondrial. Nosso laboratório mostrou anteriormente que moscas que expressam AOX apresentam uma queda dramática na viabilidade pupal quando cultivadas em uma dieta pobre em nutrientes (LN), indicando que AOX interfere no metabolismo normal do desenvolvimento. Aqui, aplicamos análises de transcriptômica e metabolômica para mostrar que a interação entre LN e a expressão ubíqua de AOX em altos níveis causa uma mudança funcional do sistema digestivo e uma alteração geral do metabolismo de aminoácidos em larvas. Estas também armazenam menos nutrientes, o que causa letalidade no final do estágio de pupa, com uma regulação negativa geral do metabolismo mitocondrial e uma clara assinatura que os indivíduos estão passando por inanição (*starvation*). Curiosamente, lactato desidrogenase, lactato e 2-hidroxiogluarato estão elevados em moscas AOX independentemente da dieta, apontando para um importante papel tanto desta enzima chave do metabolismo, quanto desses metabólitos, na regulação das mudanças fisiológicas induzidas pela função de AOX em larvas. Discutimos nossos resultados com base na disponibilidade de aminoácidos essenciais na LN e seus papéis no metabolismo do desenvolvimento de drosófila. Compreender como a AOX pode alterar as condições metabólicas normais em animais complexos e como contorná-las será de importância crucial aos possíveis tratamentos futuros de doenças humanas.

Palavras-chave: mitocôndria, restrição de nutrientes, metabolismo de amino ácidos, fosforilação oxidativa.

ABSTRACT

Despite the beneficial effects shown when the mitochondrial alternative oxidase AOX from *Ciona intestinalis* (Tunicata: Ascidiacea) is expressed xenotopically in mammalian and insect models, important detrimental outcomes have also been reported, raising concerns regarding its deployment as a therapy enzyme for human mitochondrial diseases. Because of its non-proton pumping terminal oxidase activity, AOX could bypass the cytochrome c segment of the respiratory chain and alleviate the possible overload of electrons that occurs upon oxidative phosphorylation (OXPHOS) dysfunction, not contributing though to the proton-motive force needed for mitochondrial ATP synthesis. Our lab has shown previously that AOX-expressing flies present a dramatic drop in pupal viability when cultured on a low-nutrient diet, indicating that AOX interferes with normal developmental metabolism. Here, we applied transcriptomics and metabolomics analyses to show that the interaction between low-nutrient diet and AOX expression causes functional changes in the larval digestive system and a general alteration of larval amino acid metabolism. The larvae show reduced nutrient storage, which stalls development at the late pupa stage with a general downregulation of mitochondrial metabolism and a clear signature for *starvation*. Interestingly, lactate dehydrogenase, lactate and 2-hydroxyglutarate are elevated in AOX-expressing flies, irrespective of diet, pointing to an important role for this key metabolic enzyme and metabolites in regulating the physiological changes induced by AOX function in larvae. We discuss our results based on the availability of essential amino acids in the low-nutrient diet and their roles in the developmental metabolism of flies. Understanding how AOX may change normal metabolic conditions in higher animals and how to circumvent it will be of crucial importance for possible future treatments of human diseases.

Key-words: mitochondrion, nutrient deprivation, amino acid metabolism, oxidative phosphorylation.

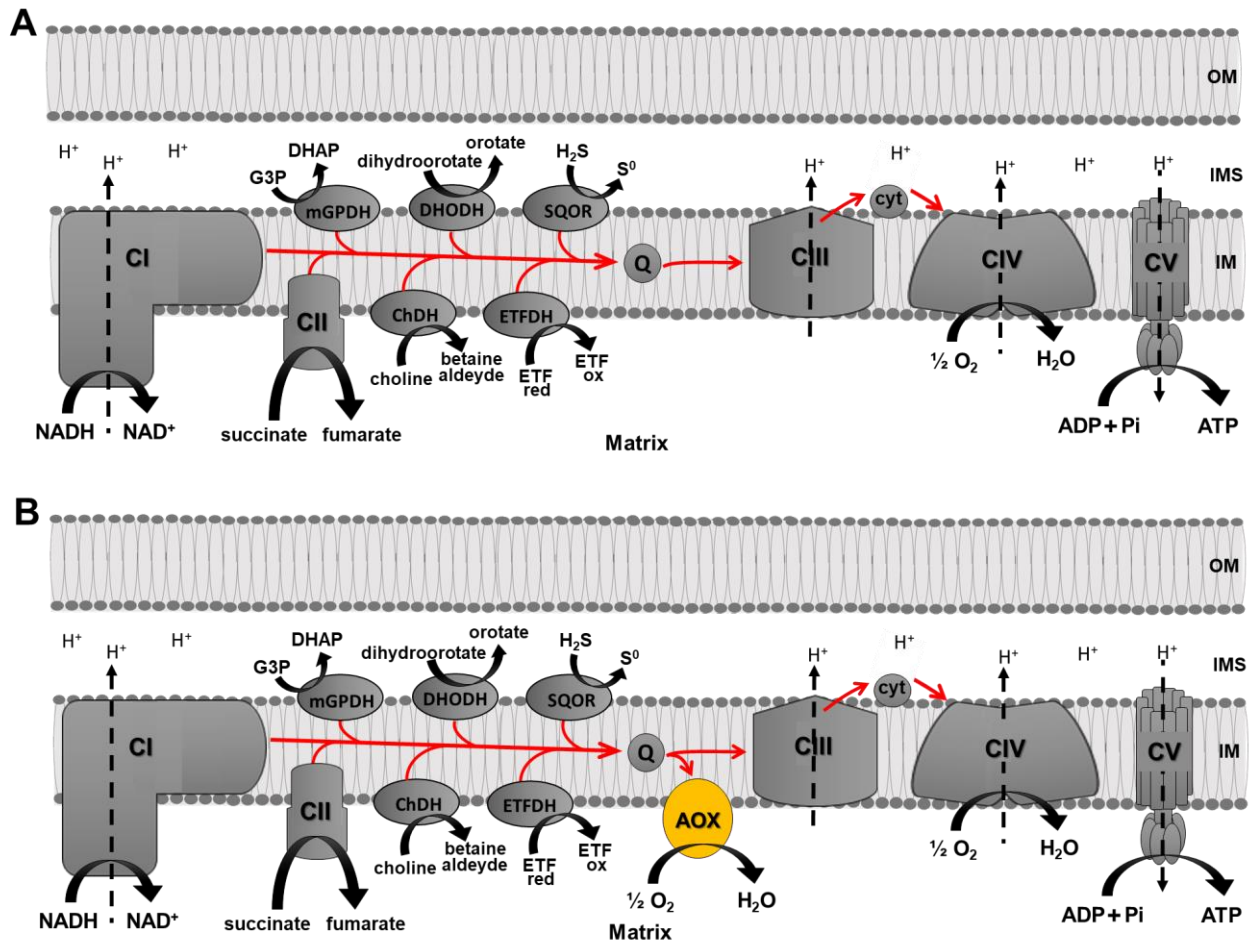
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivos gerais	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Linhagens e cruzamentos	23
4.2	Dietas utilizadas, cultura das linhagens e coleta das amostras	23
4.3	Extração de RNA e sequenciamento	24
4.4	Espectrometria de massas	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	A forte expressão ubíqua de AOX induziu mudanças funcionais e morfológicas no sistema digestivo larval	28
5.2	A interação entre a forte expressão ubíqua de AOX e dieta LN causou falha no desenvolvimento devido a starvation pupal	37
5.3	Recuperação parcial da letalidade pupal induzida por AOX por suplementação de metionina e/ou triptofano	45
5.4	Larvas AOX apresentaram marcadores metabólicos de crescimento acelerado	52
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS	61
8	MATERIAL SUPLEMENTAR	70
	APÊNDICE 1 - Systemic impact of the expression of the mitochondrial alternative oxidase on <i>Drosophila</i> development	72

1 INTRODUÇÃO

Embora as mitocôndrias tenham muitos papéis importantes nas células eucarióticas, a produção em massa de ATP via fosforilação oxidativa (OXPHOS) é tradicionalmente vista como um de seus principais processos contribuintes para a função celular. Complexos multienzimáticos e enzimas desidrogenases presentes na membrana mitocondrial interna, como a NADH desidrogenase (ou complexo I, CI), succinato desidrogenase (ou complexo II, CII), entre outras desidrogenases, iniciam o transporte de elétrons da OXPHOS ao oxidarem substratos presentes na matriz mitocondrial ou no espaço intermembranas e reduzir convergentemente o pool de ubiquinona (ou coenzima Q, CoQ) a ubiquinol (CoQH₂) (Figura 1A). Os elétrons de CoQH₂ passam então pelo complexo III (citocromo *bc1*), pelo citocromo c e chegam ao complexo IV, que irá utilizá-los para reduzir o oxigênio molecular a H₂O. No decorrer do transporte de elétrons, os complexos CI, CIII e CIV bombeiam prótons para o espaço intermembranas mitocondrial, formando um gradiente eletroquímico. Esse gradiente será eventualmente utilizado pela ATP sintase, que retorna os prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, ao passo que sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) (Figura 1A).

Figura 1. Reprodução esquemática da cadeia respiratória mitocondrial (A) e a via adicional provida pela oxidase alternativa mitocondrial (AOX) (B). Os complexos I (NADH desidrogenase) e II (succinato desidrogenase) recebem, respectivamente, elétrons presentes nos carreadores reduzidos dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina-adenina (FADH₂), resultantes dos processos de glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) e β-oxidação dos ácidos graxos, principalmente. Juntamente com a oxidação de outros substratos promovido pela atividade de outras enzimas desidrogenases representadas na figura, os elétrons resultantes chegam à cadeia respiratória e são convergidos no pool de ubiquinona (coenzima Q) que é reduzindo a ubiquinol. Em seguida, os elétrons chegam ao complexo III (citocromo *bc1*) e então ao complexo IV (citocromo *c* oxidase), o qual irá reduzir o oxigênio molecular à água. No decorrer destas reações, os complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas (IMS), formando um gradiente eletroquímico de prótons que é eventualmente utilizado pelo complexo V (ou ATP sintase) para a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) através do fosfato inorgânico (Pi), gerando ATP de maneira acoplada ao influxo de prótons do IMS de volta à matriz mitocondrial. O destino dos elétrons providos do NADH, FADH₂ e outros substratos é indicado por setas vermelhas. O bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o IMS é indicado pelas setas tracejadas, assim como o retorno destes para a síntese de ATP pelo complexo V. IM representa a membrana mitocondrial interna; OM, membrana mitocondrial externa; IMS, espaço mitocondrial interno; CI-V, complexos multienzimáticos I-V; Q, pool de ubiquinonas/ubiquinol; C, citocromo *c*; mPGDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial; DHODH, di-hidroorotato desidrogenase de classe 2; SQOR, quinona sulfeto oxirredutase; ChDH, colina desidrogenase mitocondrial; ETFDH, flavoproteína transferidora de elétrons desidrogenase. Fonte: adaptado de CAMARGO et al. (2018); MCDONALD e GOSPODARYOV (2018).



Notavelmente, o gradiente eletroquímico, a produção de ATP e EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e a reoxidação de carreadores de elétrons tanto da matriz mitocondrial quanto do citosol, são cruciais para a regulação da homeostase do metabolismo celular. Por exemplo, a função de OXPHOS afeta diretamente o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) tanto no catabolismo quanto no anabolismo, dependendo de fatores como tecido/tipo de célula, estágio de desenvolvimento, temperatura e/ou disponibilidade nutricional, entre outros (JACOBS, GEORGE, KEMPPAINEN, 2020). Dessa forma, é vastamente sabido que disfunções da OXPHOS está relacionada a várias condições de doenças humanas, podendo ser a causa de inúmeros tipos de doenças mitocondriais, cujo início e gravidade variam amplamente, e a maioria das quais ainda não tem tratamento eficaz (GORMAN et al., 2016; RUSSELL et al., 2020).

Protistas, fungos, plantas e a maioria dos metazoários, mas não vertebrados e insetos, possuem diversificações da OXPHOS que é canonicamente apresentada nos livros-textos. Uma delas é a via alternativa de transporte de elétrons fornecida por uma oxidase terminal chamada oxidase alternativa (AOX). A AOX se torna teoricamente ativa em momentos de sobrecarga de elétrons na OXPHOS, momentos esses em que o pool de ubiquinona (Q, CoQ) está sendo constantemente reduzido a ubiquinol (QH₂, CoQH₂) que é o substrato da enzima. A atividade de AOX é capaz de contornar o segmento do citocromo *c* (ou seja, a via do transporte de elétrons que abrange as atividades dos CIII e CIV) pois acopla diretamente a oxidação do pool de CoQH₂ à redução do oxigênio molecular, formando H₂O (Figura 1B). Entretanto, diferente de CIII e CIV, o transporte de elétrons realizado pela AOX não gera bombeamento de prótons para o espaço intermembranas, ou seja, não colabora diretamente para a produção de ATP mitocondrial. Pelo fato de essa enzima permitir uma "válvula de escape" ao excesso de elétrons que foi formado por alguma razão – seja por condições bióticas, abióticas ou por problemas na OXPHOS – seu papel tem sido associado à homeostase do fluxo de elétrons, do potencial redox e à neutralização de excesso da formação de EROs, condições semelhantes àsquelas encontradas em células de pacientes humanos com doenças mitocondriais. Diante disso, a expressão transgênica de AOX foi testada com sucesso em diversos modelos biológicos e se mostrou benéfica para animais complexos com disfunções da OXPHOS.

No entanto, a extensão dos estudos com a expressão de AOX em organismos modelo ainda é limitada, portanto, as alterações que pode causar no metabolismo e na fisiologia animal ainda não são totalmente compreendidas (MCDONALD e GOSPODARYOV, 2018; DOGAN et al., 2018; SAARI et al., 2019a,b), especialmente sob condições de estresse ambiental ou desafio metabólico. Nosso laboratório tem usado linhagens de *Drosophila melanogaster* expressando AOX do tunicado *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) para estudar as limitações no uso desta enzima em animais superiores e para entender como podemos ajustar sua expressão para prevenir efeitos colaterais prejudiciais. Até o momento, a reprodução e o desenvolvimento parecem ser dois dos fatores mais importantes da biologia da mosca que podem ser afetados pelo AOX (SAARI et al., 2017; SAARI et al., 2019a,b).

Recentemente nosso laboratório reportou que a combinação entre a expressão de AOX em altos níveis e de maneira ubíqua – capaz de reverter total ou parcialmente fenótipos deletérios (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; KEMPPAINEN et al., 2014; EL-KHOURY et al., 2016) –, quando combinada à exposição a uma dieta pobre em nutrientes (LN) é particularmente prejudicial ao desenvolvimento de drosófilas, causando uma queda de cerca de 80% na taxa de emergência dos indivíduos adultos (SAARI et al., 2019a,b). Esse fenótipo não pode ser resgatado pela adição de açúcares simples, vitaminas, minerais e extrato de levedura extra à dieta LN, indicando que algum distúrbio além de um déficit bioenergético direto está ocorrendo (SAARI et al., 2019a). Nossa dieta LN tem uma receita simples; sua única fonte de nutrientes, 3,5% de extrato de levedura (p/v), é claramente o suficiente para que as moscas controles (que não expressam AOX) atinjam o estágio adulto. A dieta de laboratório padrão, por outro lado, contém 1,5% de sacarose, 3% de glicose, 3,5% de extrato de levedura, 1,5% de farinha de milho, 1% de gérmen de trigo, 1% de farinha de soja e 3% de melaço, dos quais a farinha de milho, o gérmen de trigo, a farinha de soja e o melaço podem resgatar a letalidade induzida por AOX quando individualmente adicionados à dieta LN (SAARI et al., 2019a). A espectrometria de massas revelou um conjunto complexo de metabólitos no melaço, rica em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) entre outras moléculas. Entretanto, nenhum desses metabólitos testados individualmente até agora pode resgatar a letalidade de moscas que expressam AOX cultivadas em LN.

Nesse trabalho, lanço mão das abordagens ômicas para observar alterações transcricionais e metabólicas que ocorrem em larvas e pupas expressando AOX e cultivadas em dietas padrão ou LN, para melhor compreender as bases moleculares que subjazem a falha no desenvolvimento desses indivíduos e levantar hipótese acerca da influência da AOX nesse cenário. As análises dos dados de transcriptômica foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, docente pelo departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Unesp campus de Jaboticabal/SP. As análises dos dados de metabolômica foram feitas a partir de colaboração realizada com Dr. Eric Dufour, docente e pesquisador na Faculdade de Medicina e Tecnologia da Saúde, Universidade de Tampere, Finlândia, como resultado da visita realizada nessa universidade no período de setembro/2019 a março/2020 (Doutorado Sanduíche - CAPES PrInt). O manuscrito resultante do desenvolvimento desse trabalho se encontra ao final desse documento, no Apêndice 1, e engloba resultados de outros membros do laboratório que colaboraram para testar as hipóteses surgidas a partir das ômicas. Com exceção da Tabela Suplementar 1, presente ao final desse documento, as Figuras e Tabelas Suplementares citadas ao longo do texto se encontram disponíveis através da página: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.24.461559v1.supplementary-material>, a qual contém a versão pré-print e anexos do manuscrito resultante desse trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os promissores dados obtidos nos últimos anos com a expressão xenotópica de AOX em organismos-modelo de doenças humanas a destacam como uma possibilidade para futuras aplicações terapêuticas relacionadas direta ou indiretamente a disfunções da OXPHOS mitocondrial. O completo entendimento acerca dos limites e condições em que essa enzima pode ser aplicada de maneira segura torna imprescindível o desenvolvimento de trabalhos em animais modelos sob diferentes cenários. Nesse trabalho, mostramos que a alta expressão ubíqua de AOX altera significativamente, a nível molecular, dois estágios de desenvolvimento de *D. melanogaster*, larval e pupal, em ambas as condições dietéticas, destacando-se a dieta LN – na qual, como visto anteriormente, há drástica queda de viabilidade de emergência pupal. Em larvas L3, as mudanças transcriptômicas são consistentes com as mudanças na morfologia intestinal e no comportamento alimentar, como observamos no manuscrito, Apêndice 1. Essas mudanças sugerem que a expressão de AOX induz um aumento da necessidade de nutrientes da dieta. As larvas que expressam AOX também apresentam marcadores metabólicos de crescimento acentuado e, como visto no manuscrito, há maior armazenamento de proteínas e lipídios. No entanto, a dieta LN inibe drasticamente o acúmulo de biomassa na forma de lipídios pelas larvas que expressam AOX, causando prejuízo na sinalização das pupas, o aumento de estresse e respostas a *starvation* e, por fim, a falha do desenvolvimento.

Mostramos também que alterações no metabolismo de aminoácidos podem estar relacionados à falha no desenvolvimento, hipótese que foi testada e fortalecida. No manuscrito, pudemos ver que a falha foi parcialmente

recuperada pela suplementação de LN com metionina ou triptofano. O resultado da suplementação e as informações metabólicas apontam para um papel importante do metabolismo de um carbono no desenvolvimento bem-sucedido de moscas que expressam AOX.

A expressão ubíqua de AOX em níveis intermediários e a expressão tecido-específica permitem o completo desenvolvimento. Ademais, larvas expressando AOX ubiquamente em níveis intermediários acumulam biomassa e possuem o desenvolvimento melhorado em dieta SD quando estão sob estresse pelo frio (SAARI et al., 2019b), o que sugere maior crescimento, embora a dissipação de energia por calor possa também ocorrer devido ao desacoplamento mitocondrial. Partindo das indicações de nossos dados, fortalecidas pelos fenótipos apresentados no manuscrito e das informações recentemente reportadas, nosso trabalho sugere que a atividade de AOX pode modular hermeticamente o crescimento através de um equilíbrio entre o aumento do fluxo metabólico e o aumento do desacoplamento mitocondrial. O primeiro causando aumento da cataplerose e anabolismo a partir do ciclo do TCA até um ponto em que o segundo começaria a afetar a síntese de ATP e/ou produzir excesso de calor, levando, em última análise, à restrição do crescimento.

Uma vez que a falha no desenvolvimento descrita aqui depende do impacto sistêmico causado pela forte expressão ubíqua de AOX associada à dieta LN, é provável que AOX cause alterações metabólicas diferentes a depender do tecido/órgão. AOX pode influenciar o crescimento larval, agindo localmente em cada tecido/órgão, porém, em dieta LN, a integração das funções e sinalizações desses tecidos será prejudicial. Tecidos como o adiposo e o muscular – onde as larvas AOX armazenariam os nutrientes extras que foram consumidos pela maior alimentação – seriam tecidos predominantemente biossintéticos, com ativa participação anabólica da mitocôndria. Por outro lado, os sistemas nervoso e digestivo – para então fornecerem biomoléculas extras exigidas para as larvas AOX – precisariam ser mais ativos na indução do aumento do comportamento alimentar, na digestão e na absorção dos nutrientes extras consumidos; portanto, teriam mitocôndrias principalmente catabólicas e com alta necessidade de síntese de ATP. Ao aplicarmos as abordagens ômicas em larvas inteiras, certamente perdemos importantes sinais tecido-específicos e mudanças metabólicas promovidas pela AOX. Assim, ressaltamos a importância

de estudos futuros com abordagem tecido-específica acerca das modificações metabólicas causados pela AOX no desenvolvimento de larva de *D. melanogaster* e como elas interagem para promover o crescimento e o acúmulo de biomassa, ou deficiência deles, no caso da dieta LN.

O desenvolvimento da larva de *D. melanogaster* já foi postulado como um modelo para compreensão do metabolismo do crescimento tecidual animal, incluindo o do câncer. Talvez possa até ser um modelo mais realista do que células cancerosas cultivadas *in vitro*, uma vez que se pode estudar como um organismo vivo complexo regula o fluxo metabólico intrinsecamente e em tecidos periféricos, suportando as transições por estágios distintos de desenvolvimento com demandas metabólicas variadas (DRUMMOND-BARBOSA e TENNESSEN, 2020). A ideia de que determinados níveis de expressão de AOX promovem crescimento é preocupante do ponto de vista de um possível tratamento futuro das doenças mitocondriais humanas, pois ainda não se sabe se os efeitos seriam meramente hiperplásicos, hipertróficos ou até neoplásicos. Por outro lado, embora altamente especulativo, o fato de que a combinação de alta expressão de AOX e dieta pobre em nutrientes restringe severamente o crescimento também pode apontar para sua possível aplicabilidade na pesquisa de câncer. Uma melhor compreensão dos efeitos da dose e da dieta dependente da AOX no crescimento do tecido larval de *D. melanogaster* será, portanto, extremamente relevante.

7 REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-RENDÓN, J. P.; SALCEDA, R.; RIESGO-ESCOVAR, J. R. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.

ANDJELKOVIĆ, A. et al. Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 18295, 2015.

ANDJELKOVIĆ, A. et al. Expression of the alternative oxidase influences Jun N-terminal kinase signaling and cell migration. **Molecular and cellular biology**, v. 38, n. 24, p. e00110-18, 2018.

ASHBURNER, M.; THOMPSON J. R. Laboratory culture of *Drosophila*. **Genetics and biology of Drosophila**, 1978.

BAHR, J. T.; BONNER, W. D. Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. **J Biol Chem** 248: 3441–3445. 1973a.

BAHR, J. T.; BONNER, W. D. Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. **J Biol Chem** 248: 3446–3450. 1973b.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BROSNAN, M. E. et al. Division of labour: how does folate metabolism partition between one-carbon metabolism and amino acid oxidation?. **Biochemical Journal**, v. 472, n. 2, p. 135-146, 2015.

BROWN, J. B. et al. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. **Nature**, v. 512, n. 7515, p. 393-399, 2014.

BUHLER, K. et al. Growth control through regulation of insulin signalling by nutrition-activated steroid hormone in *Drosophila*. **Development**, v. 145, n. 21, p. dev165654, 2018.

CAMARGO, A. F. et al. Xenotopic expression of alternative electron transport enzymes in animal mitochondria and their impact in health and disease. **Cell biology international**, v. 42, n. 6, p. 664-669, 2018.

CANNINO, G. et al. Glucose modulates respiratory complex I activity in response to acute mitochondrial dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 46, p. 38729-38740, 2012.

CARVALHO, M. et al. Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. **Molecular systems biology**, v. 8, n. 1, p. 600, 2012.

CARVALHO, M. et al. Survival strategies of a sterol auxotroph. **Development**, v. 137, n. 21, p. 3675-3685, 2010.

CHATTERJEE, N.; PERRIMON, N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. **Science Advances**, v. 7, n. 24, p. eabg4336, 2021.

CHRÉTIEN, . et al. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 C. **PLoS biology**, v. 16, n. 1, p. e2003992, 2018.

CHURCH, R. B.; ROBERTSON, F. W. A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 162, n. 3, p. 337–351, 1966.

COLOMBANI, J.; ANDERSEN, D. S.; LÉOPOLD, P. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. **Science**, v. 336, n. 6081, p. 582-585, 2012.

CUMMINGS, J. Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes. **Clinical and Translational Science**, v. 11, n. 2, p. 147–152, 2018.

DAINES, B. et al. The *Drosophila melanogaster* transcriptome by paired-end RNA sequencing. **Genome research**, v. 21, n. 2, p. 315-324, 2011.

DASSA, E. P. et al. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. p. 30–36, 2009.

DOGAN, S. A. et al. Perturbed Redox Signaling Exacerbates a Mitochondrial Myopathy. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 764- 775.e5, 2018.

DRUMMOND-BARBOSA, D.; TENNESSEN, J. M. Reclaiming Warburg: using developmental biology to gain insight into human metabolic diseases. **Development**, v. 147, n. 11, p. dev189340, 2020.

EL-KHOURY, Riyad et al. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. **PLoS genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003182, 2013.

EL-KHOURY, R. et al. Expression of the alternative oxidase mitigates beta-amyloid production and toxicity in model systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 57–66, 2016.

FERNANDEZ-AYALA, D. J. M. et al. Expression of the *Ciona intestinalis* Alternative Oxidase (AOX) in *Drosophila* Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 449–460, 2009.

GARCIA, G. S. et al. An Affordable and Efficient" Homemade" Platform for *Drosophila* Behavioral Studies, and an Accompanying Protocol for Larval Mitochondrial Respirometry. **Journal of Visualized Experiments: Jove**, n. 175, 2021.

GARELLI, A. et al. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. **Science**, v. 336, n. 6081, p. 579-582, 2012.

GIORDANO, L. et al. Alternative Oxidase Attenuates Cigarette Smoke–induced Lung Dysfunction and Tissue Damage. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 60, n. 5, p. 515–522, 2019.

GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z. M.; RONEN, S. M. Choline metabolism in malignant transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 835-848, 2011.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2016.

GRAVELEY, B. R. et al. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 471, n. 7339, p. 473–479, 2011.

GUI, J. et al. Coupling between dynamic 3D tissue architecture and BMP morphogen signaling during *Drosophila* wing morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 10, p. 4352–4361, 2019.

HAKKAART, G. A. J. et al. Allotopic expression of amitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. **EMBO reports**, v. 7, n. 3, p. 4–8, 2006.

HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, n. December, p. 1163–1184, 2018.

HOEFNAGEL, M. H. N.; WISKICH, J. T. Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. **Arch. Biochem. Biophys.** 355, 262-270. 1998.

HONEGGER, B. et al. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. **Journal of biology**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2008.

HUANG, K. et al. Impaired peroxisomal import in *Drosophila* oenocytes causes cardiac dysfunction by inducing upd3 as a peroxikine. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2020.

HUMPHREY, D. M.; PARSONS, R. P.; LUDLOW, Z. N.; RIEMENSPERGER, T.; ESPOSITO, G.; VERSTREKEN, P. et al. Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*. **Human Molecular Genetics**, v. 21, p. 2698-2712, 2012.

JACOBS, H. T.; GEORGE, J.; KEMPPAINEN, E. Regulation of growth in *Drosophila melanogaster*: the roles of mitochondrial metabolism. **The Journal of Biochemistry**, v. 167, n. 3, p. 267-277, 2020.

JIAO, X. et al. DAVID-WS: A stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. **Bioinformatics**, v. 28, n. 13, p. 1805–1806, 2012.

JUSZCZUK, I. M.; RYCHTER, A. M. Alternative oxidase in higher plants. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1257–1271, 2003.

KAISER, P. Methionine dependence of cancer. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 568, 2020.

KALLIO, M. Aleksii et al. Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2011.

KEMPPAINEN, K. K. et al. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. **Human molecular genetics** v. 23, n. 8, p. 2078–2093, 2014.

KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature methods**, v. 12, n. 4, p. 357-360, 2015.

KING JR, M. L. The purpose of education. **Morehouse Student Newspaper: The Maroon Tiger**. 1947.

KLEPSATEL, P. et al. The influence of developmental diet on reproduction and metabolism in *Drosophila*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2020.

KUMAR, A. et al. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. **Nutrition & metabolism**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2017.

LI, H. et al. *Drosophila* larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. 1353-1358, 2017.

LI, H.; HURLBURT, A. J.; TENNESSEN, Jason M. A *Drosophila* model of combined D-2-and L-2-hydroxyglutaric aciduria reveals a mechanism linking mitochondrial citrate export with oncometabolite accumulation. **Disease models & mechanisms**, v. 11, n. 9, p. dmm035337, 2018.

LOCASALE, J. W. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 572-583, 2013.

LU, C. et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. **Nature**, v. 483, n. 7390, p. 474-478, 2012.

MARTÍNEZ-REYES, I. et al. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. **Nature**, v. 585, n. 7824, p. 288-292, 2020.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.

MATTILA, J; HIETAKANGAS, V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 207, n. 4, p. 1231-1253, 2017.

MAXWELL, D. P.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. **Plant Journal**, v. 29, n. 3, p. 269–279, 2002.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8271-8276, 1999.

MCDONALD, A. E.; GOSPODARYOV, D. V. Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: Proposed physiological roles in animals. **Mitochondrion**, v. 45, n. April 2017, p. 7–17, 2019.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.

MIGUEL-ALIAGA, I.; JASPER, H.; LEMAITRE, B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, n. 2, p. 357-396, 2018.

MILLAR, A. H. et al. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual review of plant biology**, v. 62, p. 79-104, 2011.

MIRZOYAN, Z. et al. *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. March, p. 1–16, 2019.

MOSLEMI, A.; DARIN, N. Molecular genetic and clinical aspects of mitochondrial disorders in childhood. **Mitochondrion**, v. 7, n. 4, p. 241-252, 2007.

MOUNTFORD, C. E.; WRIGHT, L. C. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model. **Trends in biochemical sciences**, v. 13, n. 5, p. 172-177, 1988.

NG, S. et al. Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. **Molecular Plant**, v. 7, n. 7, p. 1075–1093, 2014.

ONO, H. Ecdysone differentially regulates metamorphic timing relative to 20-hydroxyecdysone by antagonizing juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. **Developmental biology**, v. 391, n. 1, p. 32-42, 2014.

PADMANABHA, D.; BAKER, K. D. *Drosophila* gains traction as a repurposed tool

to investigate metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 518–527, 2014.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PLATTEN, M. et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 5, p. 379-401, 2019.

POE, A. R. et al. Low FoxO expression in drosophila somatosensory neurons protects dendrite growth under nutrient restriction. **eLife**, v. 9, p. 1–47, 2020.

RAJENDRAN, J. et al. Alternative oxidase-mediated respiration prevents lethal mitochondrial cardiomyopathy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2019.

RAVASZ, D. et al. Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation. **Neurochemistry international**, v. 109, p. 41-53, 2017.

RAY, M.; LAKHOTIA, S. C. Activated Ras/JNK driven Dilp8 in imaginal discs adversely affects organismal homeostasis during early pupal stage in *Drosophila*, a new checkpoint for development. **Developmental Dynamics**, v. 248, n. 12, p. 1211-1231, 2019.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009.

ROGOV, A. G. et al. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 13, p. 1615-1634, 2014.

RUSSELL, O. M. et al. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. **Cell**, v. 181, n. 1, p. 168–188, 2020.

RUSTIN, P.; JACOBS, H. T. Respiratory chain alternative enzymes as tools to better understand and counteract respiratory chain deficiencies in human cells and animals. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 362–370, 2009.

SAARI, S. et al. Alternative oxidase confers nutritional limitation on *Drosophila* development. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 331, n. 6, p. 341–356, 2019a.

SAARI, S. et al. Alternative respiratory chain enzymes : Therapeutic potential and possible. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. October 2018, p. 854–866, 2019b.

SAARI, S. et al. Expression of *Ciona intestinalis* AOX causes male reproductive

defects in *Drosophila melanogaster*. **BMC Developmental Biology**, p. 1–11, 2017.

SANDERSON, S. M. et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 11, p. 625-637, 2019.

SANZ, A. et al. Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9105–9110, 2010.

SCIACOVELLI, M. et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. 544-547, 2016.

SOMMER, N. et al. Bypassing mitochondrial complex III using alternative oxidase inhibits acute pulmonary oxygen sensing. **Science Advances**, v. 6, n. 16, 2020.

STAFFAN SVENSSON, Å.; RASMUSSEN, A. G. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. **Plant Journal**, v. 28, n. 1, p. 73–82, 2001.

SULLIVAN, D. T.; SULLIVAN, M. C. Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. **Biochemical genetics**, v. 13, n. 9-10, p. 603-613, 1975.

SZIBOR, M. et al. Bioenergetic consequences from xenotopic expression of a tunicate AOX in mouse mitochondria: Switch from RET and ROS to FET. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1861, n. 2, 2020.

SZIBOR, M. et al. Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **Disease models & mechanisms**, v. 10, n. 2, p. 163-171, 2017.

TENG, X. et al. Lactate dehydrogenase C produces S-2-hydroxyglutarate in mouse testis. **ACS chemical biology**, v. 11, n. 9, p. 2420-2427, 2016.

TENNESSEN, J. M. et al. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 139–148, 2011.

TENNESSEN, J. M.; THUMMEL, C. S. Coordinating growth and maturation - Insights from *Drosophila*. **Current Biology**, v. 21, n. 18, p. R750–R757, 2011.

THOMAZELLA, D. P. et al. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012.

TRETTETTER, L.; PATOCS, A.; CHINOPOULOS, C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1857, n. 8, p. 1086-1101, 2016.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 2016.

UMBACH, A. L. et al. Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: Insights from site-directed mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1554, n. 1–2, p. 118–128, 2002.

VANLERBERGHE, G. C.; MARTYN, G. D.; DAHAL, K. Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 157, n. 3, p. 322-337, 2016.

VANLERBERGHE, G. C.; MCINTOSH, L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 115-119, 1992.

VARTIAINEN, S. et al. Phenotypic rescue of a *Drosophila* model of mitochondrial ANT1 disease. p. 635–648, 2014.

VAUPEL, P.; MULTHOFF, G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 6, p. 1745-1757, 2021.

VON FRIELING, J. et al. A high-fat diet induces a microbiota-dependent increase in stem cell activity in the *Drosophila* intestine. **PLoS Genetics**, v. 16, n. 5, p. e1008789, 2020.

WAYDHAS, C.; WEIGL, K.; SIES, H. The disposition of formaldehyde and formate arising from drug N-demethylations dependent on cytochrome P-450 in hepatocytes and in perfused rat liver. **European journal of biochemistry**, v. 89, n. 1, p. 143-150, 1978.

WISIDAGAMA, D. R.; THUMMEL, C. S. Regulation of *Drosophila* intestinal stem cell proliferation by enterocyte mitochondrial pyruvate metabolism. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 11, p. 3623-3630, 2019.

WU, M.; PASTOR-PAREJA, J. C.; XU, T. Interaction between Ras V12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 545-548, 2010.

YALCIN, S. et al. Effects of the usage of dried brewing yeast in the diets on the performance, egg traits and blood parameters in quails. **Animal**, v. 2, n. 12, p. 1780-1785, 2008.

YANG, M.; VOUSDEN, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 650-662, 2016.

YUN, J.; FINKEL, T. Mitohormesis. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 757–766, 2014.