



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

Geovana Siqueira Garcia

**Avaliação do potencial termogênico da oxidase alternativa
mitocondrial expressa em *Drosophila melanogaster***

São José do Rio Preto
2019

Geovana Siqueira Garcia

**Avaliação do potencial termogênico da oxidase alternativa
mitocondrial expressa em *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/03806-7

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto
2019

ERRATA

GARCIA, Geovana Siqueira. **Avaliação do potencial termogênico da oxidase alternativa mitocondrial expressa em *Drosophila melanogaster***. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José do Rio Preto, 2019.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
2	12	Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/03806-7.	Financiadoras: FAPESP e CAPES – Proc. FAPESP nº 2017/03806-7.
3	12	Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/03806-7.	Financiadoras: FAPESP e CAPES – Proc. FAPESP nº 2017/03806-7.
5	10	Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/03806-7.	Agradeço à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo FAPESP nº 2017/03806-7.

G216a Garcia, Geovana Siqueira
Avaliação do potencial termogênico da oxidase alternativa
mitocondrial expressa em *Drosophila melanogaster* / Geovana
Siqueira Garcia. -- São José do Rio Preto, 2019
72 f. : il., tabs. + 1 CD-ROM

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

1. Bioquímica. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Metabolismo
energético. 4. Calor animal. 5. Stress (Fisiologia). 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.

Geovana Siqueira Garcia

**Avaliação do potencial termogênico da oxidase alternativa
mitocondrial expressa em *Drosophila melanogaster*:**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/03806-7

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
UNESP – Câmpus de Jaboticabal
Orientador

Prof^a. Dr^a. Luciane Carla Alberici
USP– Câmpus de Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Góes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Jaboticabal
19 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

À força Divina que, diante de minha fé, tem me amparado, movendo-me até aqui e proporcionando um destino que me instiga a expressar extrema gratidão.

Aos meus pais, Edson e Lusineide, por confiarem nas minhas escolhas, pela motivação propiciada e por sempre referirem-se a mim como alguém muito maior e capaz do que verdadeiramente sou.

À minha irmã Luana que me incentivou a prestar o vestibular na universidade pública e a cursar ciências biológicas, mesmo carregando consigo um pavor imenso sobre “briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas”. Muito obrigada por contribuir tanto às construções dos meus sonhos. Aprendi que fazer o que gosto é primordial para uma vida, não mais fácil, mas leve e feliz.

Ao meu irmão Felipe que, embora muito jovem ainda, me inspira demasiadamente, acalenta meus sonhos como se fossem os dele e me ensina tantos saberes. Muito obrigada por se interessar tanto pelo meu trabalho e por sempre ter uma “pergunta” especial para me fazer sobre as pesquisas.

À extraordinária equipe de trabalho a qual compartilho meu cotidiano. Em 2015 iniciei as minhas atividades nesse laboratório, juntamente a estas, instaurei um novo ciclo que me tornou uma pessoa muito melhor. Alguns já seguiram caminhos distintos, outros continuam desde o início, certo é que todos contribuíram de alguma forma. Pelo trabalho, pelas discussões científicas e pelas descontrações, agradeço imensamente: nossos dias foram em sua maioria regados por alegria e isso nos ajudou a produzirmos, mesmo diante das dificuldades de todos os aspectos que nos afligem diariamente. Especialmente, agradeço aos que são além de companheiros de trabalho, grandes amigos: Marina, Ana Paula e André.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcos Túlio, sempre muito cuidadoso, presente e paciente, exemplo de profissional. Desejo que, com sua competência, oriente muitos outros alunos, promovendo bons profissionais.

À professora Dra. Kênia Bícago do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV/ UNESP) por oferecer a câmera termográfica e todo auxílio necessário às análises de termografia. Obrigada também ao Diogo, seu aluno, por ter se empenhado em ajudar-me.

Ao IBILCE e à FCAV, por serem *campi* de excelência, mesmo diante de crises financeiras, incluindo todos os profissionais que trabalham para isso, especialmente aos professores.

Às professoras Dra. Luciane Alberici e Dra. Rejane Góes por aceitarem prontamente o convite para constituírem a banca e pelas contribuições científicas.

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/03806-7.

A todos que contribuíram de quaisquer outras formas, muitíssimo obrigada. O meu título é fruto de uma construção diária e coletiva. Minha jornada segue mais rica em conhecimento e fortificada.

RESUMO

A oxidase alternativa (AOX) é uma enzima com função de química redox semelhante aos complexos III e IV da cadeia respiratória (CR), porém, sem bombeamento de prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria. Assim, ela não contribui à força próton-motriz que leva à produção de ATP e a energia é dissipada em forma de calor. AOX está presente na maioria dos metazoários, mas ausente em vertebrados e insetos, os quais perderam independentemente ao longo da evolução o gene que a codifica. Quando foi expressa transgenicamente em *Drosophila melanogaster* e outros modelos experimentais, AOX de *Ciona intestinalis* proporcionou melhoria nas condições associadas a disfunções mitocondriais, apresentando-se com potencial terapêutico. Os efeitos benéficos, entretanto, contrastam-se com a falta de investigação aprofundada da biologia da AOX em animais, principalmente em condições laboratoriais que mimetizam as da natureza. Considerando isso e o conhecimento sobre sua função termogênica em plantas, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos da expressão de AOX em *D. melanogaster* sob variação térmica, testando a hipótese de que ela gera um aumento na temperatura corpórea do organismo. Linhagens expressando AOX em diferentes níveis foram submetidas a variadas temperaturas, incluindo condições severas de estresse térmico para análises durante o desenvolvimento e a fase adulta dessas moscas. AOX promoveu um aceleração dose-dependente no desenvolvimento, aumentou significativamente a viabilidade dos ovos/larvas em baixas temperaturas (12 e 15°C), além de maior resistência ao frio (0°C) e recuperação mais rápida após exposição a este tipo de estresse em adultos. Imagens de termografia de infravermelho em larvas também apontaram um aumento na temperatura corpórea larval. Embora os dados sejam consistentes com a hipótese de produção de calor, análises *in vitro* de respirometria em extratos larvais não evidenciaram efeitos bioquímicos significativos da expressão da AOX no consumo de oxigênio mitocondrial, os quais pudessem explicar qualquer mecanismo termogênico. Portanto, a AOX mitiga os efeitos do frio, através de um complexo papel no metabolismo animal, o qual ainda precisa ser melhor elucidado.

Palavras-chave: Oxidase alternativa. Cadeia respiratória. Termogênese. Mitocôndria. *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Alternative oxidase (AOX) is an enzyme that catalyzes a redox reaction similarly to complexes III and IV of the respiratory chain (RC), but without the proton pumping into the mitochondrial intermembrane space. It therefore does not contribute to the proton-motive force that leads to ATP production and so the energy is dissipated as heat. AOX is present in most metazoans, but not in vertebrates and insects, which independently lost throughout evolution its coding gene. When the enzyme was expressed transgenically in *Drosophila melanogaster* and other experimental models, AOX improved in the deleterious conditions associated to mitochondrial dysfunctions, presenting with a therapeutic potential. The beneficial effects, however, contrast with the lack of in-depth information about the biology of AOX in animals, especially in nature-like laboratory conditions. Considering this and the knowledge about its thermogenic function in plants, we aimed at investigating the effects of AOX expression in *D. melanogaster* under varying thermal conditions, testing the hypothesis that the enzyme generates an increase in organismal body temperature. We submitted different AOX-expressing lines to various temperatures, including severe stress conditions for analysis during development and during the adult stage. AOX promoted dose-dependent acceleration in development, significantly increased viability of eggs/larvae at low temperatures (12 and 15°C). It also promoted higher resistance to cold (0°C) and faster recovery after cold exposure in adults. Infrared thermography images of larvae showed an increase in larval body temperature. Although the data are consistent with the heat generation hypothesis, *in vitro* respirometry analysis in larval extracts did not show significant biochemical effects of AOX expression on mitochondrial oxygen consumption, which could explain any thermogenic mechanism. Therefore, AOX attenuates the effects of cold, through a complex role in animal metabolism, which warrants further investigation.

Keywords: Oxidase alternative. Respiratory chain. Thermogenesis. Mitochondria. *Drosophila melanogaster*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial na presença de AOX.	28
Figura 2 – Viabilidade dos ovos/larvas (A) e das pupas (B) às temperaturas indicadas	40
Figura 3 – Tempo de desenvolvimento de ovo até pupa (A) e de ovo até adulto (B) das linhagens AOX e controle às temperaturas indicadas	42
Figura 4 – Tempo levado para completa imobilização no gelo das moscas adultas <i>tubAOX</i> (A) e <i>UAS-AOX/daGAL4</i> (B) e seus respectivos controles.	43
Figura 5 – Tempo levado para completa recuperação das moscas após imobilização no gelo durante os tempos indicados.	44
Figura 6 – Termografia de infravermelho mostra pequenas diferenças de temperatura entre as larvas de <i>3xtubAOX</i> e <i>w¹¹¹⁸</i> .	45
Figura 7 – Consumo de oxigênio mitocondrial de homogeneizados de larvas L3 dos genótipos indicados em diferentes temperaturas.	46
Figura 8 – AOX não altera a síntese de ATP mitocondrial de larvas.	47
Quadro 1 – Descrição resumida das linhagens transgênicas utilizadas que expressam a AOX funcional (linhagens AOX).	34

LISTA DE TABELAS

Tabela A.1 – Valores de viabilidade dos ovos/larvas (OV) calculados como a 67
proporção de ovos desenvolvidos em pupas nas temperaturas indicadas.

Tabela B.1 –. Valores de viabilidade pupal (PV) calculados como a 68
proporção de pupas desenvolvidas em adultos nas temperaturas indicadas.

Tabela C.1 – Valores de tempo desenvolvimento de ovos até pupas (TDP) 69
calculados como a média do tempo em dias.

Tabela D.1 – Valores de tempo desenvolvimento de ovos até adultos (TDA) 70
calculados como a média do tempo em dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ANDH	NADH desidrogenases alternativas
ANT	Translocases de nucleotídeos de adenina
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina do soro bovino
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CIV	Complexo IV
CR	Cadeia respiratória
CV	Complexo V
dERR	Receptor relacionado ao estrogênio de <i>Drosophila</i>
EIM	Espaço intermembranas da mitocôndria
FADH₂	Dinucleotídeo de flavina-adenina
G3P	Glicerol 3-fosfato
G3PDH	Glicerol 3-fosfato desidrogenase mitocondrial
GTP	Trifosfato de guanosina
HSP	Proteína de choque térmico
L1	Larvas de primeiro ínstar
L2	Larvas de segundo instar
L3	Larvas de terceiro ínstar
ME	Membrana mitocondrial externa
MI	Membrana mitocondrial interna
mtDNA	DNA mitocondrial

NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PGC-1α	Proteína coativadora 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomos
RCR	Taxa de controle respiratório
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Retículo sarcoplasmático
TCA	Ciclo do ácido cítrico
TRP	Canais iônicos receptores de potencial transitório Receptores de potencial transitório
UCPs	Proteínas desacopladoras

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO GERAL	15
2.1	Objetivos específicos:	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Temperatura e sua influência no metabolismo animal	16
3.1.1	Estresse térmico e termorregulação	17
3.2	Produção de calor nos animais	20
3.3	Mitocôndrias	22
3.3.1	Cadeia respiratória e produção de calor via desacoplamento mitocondrial.....	24
3.3.2	Enzimas alternativas da CR mitocondrial	27
3.4	Uso de <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo-modelo	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Linhagens	33
4.2	Análises fenotípicas	35
4.2.1	Ensaio de desenvolvimento	35
4.2.2	Tratamento com gelo	35
4.3	Análises de respirometria	36
4.3.1	Quantificação proteica	37
4.4	Termografia de infravermelho	38
4.5	Análises estatísticas	38
5	RESULTADOS	38
5.1	A expressão de AOX aumenta as taxas de viabilidade dos ovos/larvas e pupas em baixas temperaturas	38
5.2	AOX acelera o desenvolvimento de maneira dose-dependente em baixas temperaturas	41

5.3	AOX proporciona maior resistência e acelera a recuperação após exposição prolongada ao gelo	42
5.4	Termografia de infravermelho detecta temperaturas mais elevadas em larvas que expressam AOX	44
5.5	Parâmetros do funcionamento mitocondrial não são substancialmente afetados em baixas temperaturas devido à expressão de AOX.....	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A: Taxas de viabilidade dos ovos/larvas e classes estatísticas	67
	APÊNDICE B: Taxas de viabilidade pupal e classes estatísticas	68
	APÊNDICE C: Tempo de desenvolvimento das pupas e classes estatísticas ...	69
	APÊNDICE D: Tempo de desenvolvimento dos adultos e classes estatísticas.	70

1 INTRODUÇÃO

Na cadeia respiratória (CR) da maioria dos eucariotos, incluindo certos fungos, protozoários, plantas e vários metazoários (MCDONALD; VANLERBERGHE, 2004; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009), são encontradas enzimas alternativas capazes de substituir parcialmente o complexo I (i. e., NADH desidrogenases alternativas, ANDH) ou os complexos III-IV (i. e., oxidase alternativa, AOX). Estas enzimas, embora desempenhem reações redox, como os respectivos complexos, não bombeiam prótons para o espaço intermembranas, reduzindo, assim, o potencial eletroquímico utilizado para a produção da principal molécula energética das células, o trifosfato de adenosina (do inglês, ATP).

A AOX oxida o ubiquinol (o qual carrega elétrons provenientes dos complexos I, II, glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial, ETF:Q oxidoredutase ou outras desidrogenases) e reduz o oxigênio à água, semelhantemente à atividade redox do segmento do citocromo c da CR (JUSZCZUK; RYCHTER, 2003). As funções dessa enzima, principalmente em metazoários não são bem esclarecidas. No entanto, em plantas termogênicas sabe-se que a AOX desempenha um papel importante na produção de calor em órgãos específicos (MEEUSE, 1975; MOORE *et al.*, 2013; RASMUSSEN; SOOLE; ELTHON, 2009;), como é o caso da flor-de-lótus *Nelumbo nucifera* (Magnoliophyta: Nelumbonaceae), onde cerca de 75% dos elétrons da CR são desviados para a via da AOX com dissipação de energia que pode aumentar a temperatura das flores em até 20°C acima da temperatura ambiente (WATLING *et al.*, 2006).

Embora amplamente presentes na maioria dos grupos do reino animal, vertebrados e insetos perderam independentemente os genes que codificam as enzimas alternativas ao longo da evolução (MCDONALD; VANLERBERGHE, 2004; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009). Porém, o gene da AOX proveniente de *Ciona intestinalis* (Tunicata: Ascidiaceae), representante de um grupo-irmão de Vertebrata, foi expresso transgenicamente nas mitocôndrias de moscas *Drosophila melanogaster* (linhagens/moscas AOX) e em outros modelos biológicos com sucesso (DASSA *et al.* 2009; FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009 HAKKAART *et al.* 2006; KEMPPAINEN, *et al.*, 2014; SZIBOR *et al.* 2017). A ideia era testar se a via alternativa conferida pela AOX poderia atuar em condições de

estresse respiratório ou sobrecarga dos complexos III e IV, reduzindo o nível de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) e consequentemente reestabelecendo o consumo de oxigênio. Este conceito tem sido explorado com certo sucesso desde então em busca de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças mitocondriais (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; KEMPPAINEN, *et al.*, 2014).

Notavelmente, efeitos negativos da expressão de AOX já foram observados, como defeitos reprodutivos em drosófilas machos. Estes não acumulam eficientemente espermatozoides maduros na vesícula seminal, o que os coloca em desvantagem quando testados em competição de esperma com machos controles (SAARI *et al.*, 2017). Embora muitos desses efeitos fenotípicos estejam provavelmente envolvidos à diversidade de papéis que a mitocôndria exerce no organismo, os processos biológicos básicos desencadeados pela expressão da AOX não estão precisamente elucidados, o que salienta a necessidade de uma investigação aprofundada da biologia da enzima em metazoários. É destacável, portanto, a importância de averiguar se AOX é capaz de produzir calor a nível subcelular também em animais, e como estes respondem fisiológica e bioquimicamente a temperaturas adversas, já que o possível aumento de temperatura pode constituir um efeito colateral indesejável se AOX vier a ser usada em futuras terapias.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos de diferentes temperaturas, incluindo condições severas de estresse térmico, em linhagens de *D. melanogaster* expressando o gene da AOX de *C. intestinalis*. A hipótese geral do trabalho é a de que parte da energia dos elétrons que são desviados para a via da AOX é dissipada como calor, aumentando a temperatura interna das drosófilas e promovendo vantagens em temperaturas frias.

2.1 Objetivos específicos:

- a) investigar os efeitos de baixas e altas temperaturas no desenvolvimento das moscas AOX para testar a hipótese de que AOX altera a faixa de temperatura que proporciona as condições ótimas de desenvolvimento para *D. melanogaster*, acelerando o tempo de desenvolvimento e aumentando a viabilidade de ovos, larvas e pupas em temperaturas mais baixas;
- b) analisar os efeitos de tratamentos no frio (0°C) em indivíduos adultos expressando AOX para testar a hipótese de que moscas AOX são mais resistentes a e se recuperam mais rapidamente de tal estresse térmico;
- c) aferir a emissão de raios infra-vermelhos produzidos por linhagens AOX através de termografia para testar a hipótese de que as possíveis respostas fisiológicas conferidas à *D. melanogaster* ocorrem devido à produção de calor corpóreo pela AOX;
- d) medir o consumo de oxigênio mitocondrial e inferir parâmetros respiratórios para analisar bioquimicamente os efeitos metabólicos da AOX em diferentes temperaturas e testar a hipótese de que em baixas temperaturas a via alternativa da AOX contribui significativamente para a respiração mitocondrial;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Temperatura e sua influência no metabolismo animal

Todo o arredor de um organismo, incluindo os componentes físicos, químicos e bióticos, pode ser definido como o ambiente, o qual propicia desafios à vida, levando a adaptações ou a extinções. Dentre esses componentes, três condições físico-químicas são consideradas “pilares” para a diversidade de vida na Terra: a temperatura, o oxigênio e a água. Tais parâmetros variam ao longo dos mais diversos ambientes, o que leva à variação da forma como os organismos lidam com isso, adaptam-se e diversificam-se (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

A temperatura consiste numa medida de intensidade da agitação dos átomos e moléculas em um determinado material. Átomos e moléculas se movimentam constantemente, porém, quanto maior a temperatura, maior é a intensidade dessa agitação e vice-versa. O oxigênio (O_2) é consumido durante processos de conversão energética pelo organismo, os quais constituem o metabolismo. Sendo assim, a taxa de consumo de O_2 de um animal é utilizada para estimar a taxa metabólica. A partir da metabolização de compostos orgânicos são liberados elétrons, e mecanismos bioquímicos, envolvendo reações de óxido-redução, levam à transferência desses elétrons até a redução do O_2 , gerando água. Além de ser o solvente universal (importante à composição dos líquidos corporais), a água é juntamente à temperatura, necessária para a manutenção das propriedades químicas e funcionais das macromoléculas dos sistemas biológicos (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Notavelmente, a temperatura é um fator abiótico que influencia fortemente o metabolismo animal. As reações químicas, principalmente as enzimáticas, são dependentes da temperatura, sendo que as baixas desaceleram-nas, diminuindo a taxa metabólica e as altas aceleram-nas, aumentando a taxa metabólica (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000). As membranas celulares também têm a fluidez alterada em decorrência à variação térmica, o que pode influenciar algumas funções celulares, incluindo os processos de transporte e a permeabilidade celular, além de outros processos essenciais já que, além da membrana plasmática, várias organelas de eucariotos são envoltas por membranas. (FARKAS *et al.*, 1984; QUINN, 1988; HAZEL *et al.*, 1995).

3.1.1 Estresse térmico e termorregulação

Quando submetidos a temperaturas abaixo ou acima do espectro ótimo para o funcionamento do organismo, os animais podem sofrer estresse térmico e gerar respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas para se adequarem a esta condição (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000). Uma resposta ao estresse, incluindo o térmico, muito conservada entre os seres vivos consiste no aumento da síntese de proteínas de choque térmico (do inglês, HSP), também conhecidas como chaperonas. Estas lidam com os danos causados pelo estresse em outras proteínas, atuando no dobramento, desdobramento, montagem e transporte de proteínas, vias de sinalização, ativação de enzimas e receptores, e até mesmo na degradação de proteínas agregadas. Isso auxilia a manutenção das funções celulares, mesmo em uma condição térmica adversa. (FEDER; HOFMANN, 1999; PARSELL; LINDQUIST, 1993; SORENSEN; KRISTENSEN; LOESCHCKE, 2003).

Os animais que usam fontes de calor endógenas para termorregulação (endotérmicos), como os mamíferos, capazes de manter a temperatura do corpo constante mesmo sob oscilações térmicas ambientais, têm um gasto energético metabólico para tal. Já aqueles que usam fontes de energia externas ao organismo para regular a temperatura corporal (ectotérmicos), estão sujeitos a alterações na taxa metabólica correspondentes às flutuações de temperaturas do ambiente (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000).

Entretanto, em resposta à variação térmica a longo prazo, até mesmo os ectotérmicos podem regular a capacidade metabólica de seus tecidos, de tal forma que algumas reações permaneçam relativamente constantes, mesmo quando a temperatura corporal varia (processo denominado como aclimação). Animais aclimatados a um ambiente frio têm a atividade de enzimas mitocondriais aumentadas, para que haja uma compensação da capacidade aeróbica que fica mais restrita pela influência da temperatura do ambiente (GUDERLEY, 2004; SEEBACHER, 2005; ST-PIERRE; CHAREST; GUDERLEY, 1998). Insetos aclimatam-se à temperatura em que se desenvolvem, alterando a faixa de preferência térmica nos adultos: quando passam o desenvolvimento em temperaturas frias, os adultos preferem temperaturas mais baixas em relação àqueles que se desenvolveram em temperaturas mais altas. Os ectotérmicos podem também ajustar comportamentalmente a temperatura corporal, como por exemplo,

através de vaivém entre sombra e sol. No caso de insetos que são colocados em um gradiente térmico de laboratório, estes tendem a se locomoverem para as regiões cujas temperaturas são mais próximas da faixa ótima para o funcionamento do seu organismo. Nesse sentido, os efeitos da temperatura em ectotérmicos atingem mais profundamente a fisiologia, a ecologia e o sucesso reprodutivo. Mesmo que a variação de temperatura esteja dentro dos limites tolerados, os quais não são tão prejudiciais ou até mesmo letais, geram-se consequências na performance do animal, que podem ter, portanto, uma mudança de valor adaptativo (DILLON *et al.*, 2009).

Considerando a dependência da temperatura para manutenção das atividades vitais e a necessidade de adaptação ao ambiente para sobrevivência, os organismos desenvolveram termorregulação, que constitui um conjunto de mecanismos pelos quais estes realizam a percepção da temperatura do ambiente, gerando uma resposta apropriada para manter o meio interno relativamente estável (NAKAMURA; MORRISON, 2008; SEEBACHER, 2009). Os processos termorregulatórios são mais bem compreendidos entre os vertebrados, principalmente mamíferos, devido a interesses clínicos (SEEBACHER, 2009). Nesses animais o sistema nervoso exerce um papel na regulação do metabolismo celular, intermediando a percepção do meio externo com o metabolismo celular e induzindo respostas que aumentam a expressão de reguladores de genes metabólicos (MORRISON; NAKAMURA; MADDEN, 2008). Proteínas denominadas “canais iônicos receptores de potencial transitório” (do inglês, TRP) presentes em neurônios sensoriais atuam na detecção de temperaturas altas e baixas, consequentemente na termorregulação e na modulação do metabolismo (WANG; SIEMENS, 2015). Uma vez que a mitocôndria é a principal responsável pela conversão de energia química (ver seção 3.3) e produção de calor, fatores de transcrição regulam o metabolismo oxidativo e assim, dependendo das condições do meio, atuam aumentando a biogênese mitocondrial e a expressão de genes que atuam em vias metabólicas, como a fosforilação oxidativa (do inglês, OXPHOS). Neste contexto, em resposta a estímulos, incluindo exercícios e temperatura, uma das proteínas reguladoras mais importantes é a coativadora 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomos (PGC-1 α). É postulado que esta tenha um papel crucial no metabolismo mitocondrial, coordenando a biogênese desta organela e a expressão de proteínas que participam da oxidação de ácidos graxos e respiração

mitocondrial (GERHART-HINES *et al.*, 2007; LIN, 2009; LIN; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2005; PUIGSERVER *et al.*, 1998)

Entretanto, todos grupos de seres vivos, que se distribuem entre os mais diversos ambientes, também precisam termorregular e certamente ainda há muito para se entender acerca desses aspectos. Os insetos, por exemplo, incluem grupos que se mantêm ativos em temperaturas tão baixas quanto -16°C (KOHSIMA, 1984), bem como termorreguladores que ao voarem apresentam temperatura corporal acima daquela de vertebrados até então considerados os mais quentes já encontrados (HEINRICH, 1989; HEINRICH, 1995). Estudos com abelhas mostraram ainda mecanismos de termorregulação para manutenção da temperatura em colônias, um processo importante para o desenvolvimento das larvas as quais só se desenvolvem numa faixa estrita de temperatura ($33-36^{\circ}\text{C}$). Alguns indivíduos produzem calor através do músculo do voo torácico e quando ocorre resfriamento da colônia, o número de indivíduos que realizam esse processo aumenta, principalmente no ninho (STABENTHEINER; KOVAC; BRODSCHNEIDER, 2010). Em *Drosophila*, um conjunto de sensores moleculares análogos às TRPs de mamíferos já foram identificados, os quais são essenciais para responderem a estímulos de temperaturas, demonstrando que alguns mecanismos são conservados entre os grupos (DILLON *et al.* 2009; SOKABE; TOMINAGA, 2009).

Interessantemente um estudo recente demonstrou que o lagarto teiú *Salvator merianae* (Reptilia: Teiidae), vertebrado de aproximadamente 2 kg considerado até então ectotérmico, realiza endotermia durante a estação reprodutiva: isolado em uma toca, este animal pode gerar um calor capaz de aumentar endogenamente sua temperatura corporal em aproximadamente 6°C em relação à temperatura do ambiente (TATTERSALL *et al.*, 2016). O fato é interessante porque o teiú apresenta um baixo isolamento corporal, um dos principais critérios usados pela ciência para explicar a ectotermia. Considerando que o calor é subproduto de todas as reações energéticas do organismo, todos os animais acabam por gerar calor, porém, nos ectotérmicos a produção de calor ocorre em taxas muito menores que nos endotérmicos e os primeiros apresentam elevadas condutâncias térmicas, ou seja, não conseguem aquecer o próprio corpo com o calor produzido (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Este não foi o primeiro achado sobre endotermia durante a fase reprodutiva, pois um fenômeno de produção de calor por tremor já tinha sido descrito com a cobra píton diamante,

Morelia spilota (Reptilia: Boidae), durante a incubação dos ovos (SLIP; SHINE, 1988). Tais trabalhos vêm a fornecer evidências para a compreensão da evolução convergente da endotermia nos animais. No entanto, nem todos os mecanismos moleculares pelos quais isso acontece são conhecidos (FARMER, 2016; TATTERSALL *et al.*, 2016;).

3.2 Produção de calor nos animais

Embora alguns estudiosos da termodinâmica considerem o calor como um processo de transferência de energia, ele pode ser definido como uma energia resultante do movimento aleatório de átomos e moléculas que compõem uma determinada matéria, ou seja, é uma energia cinética molecular (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Para se compreender a produção de calor nos organismos, faz-se importante entender que nem todas as formas de energia são capazes de realizar trabalho biológico, isto é, sintetizar macromoléculas, transportar íons, gerar contração muscular, etc. Nesse sentido, os tipos de energia podem ser classificados em energias de alta graduação (que produzem trabalho), sendo elas energia química, mecânica ou elétrica, por exemplo, e em energias de baixa graduação (incapazes de realizar trabalho biológico), como o calor (BIANCO, 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Ao contrário de um sistema termodinâmico artificial, no qual o calor pode ser convertido em trabalho quando há diferença na temperatura de um local para o outro dentro do mesmo, num sistema biológico isso não é possível. Levando-se em conta as diferenças de temperatura pequenas dentro de uma célula, o calor teoricamente não é aproveitado para realizar trabalho. Isso não significa que o calor não tenha importância nos sistemas biológicos. Muito pelo contrário, ele influencia as taxas metabólicas e a conformação das macromoléculas, desempenhando um papel fundamental à manutenção das atividades vitais dos organismos (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Nos organismos, os processos de transformação energética de alta graduação não são totalmente eficientes, de tal modo que parte dessa energia é liberada como calor. Por isso, o calor é uma consequência do metabolismo energético, ao mesmo tempo que ele influencia a taxa metabólica, acelerando-a. Uma vez que a geração de calor se relaciona com a transformação da energia, do

ponto de vista bioquímico, ela pode ser resultante das reações de hidrólise ou estar relacionada ao processo que leva a síntese da principal molécula energética utilizada pelos organismos eucariotos para exercerem suas atividades celulares, o ATP (BIANCO, 2000; MOYES; SCHULTE, 2010).

No caso da hidrólise, por exemplo, a célula muscular transforma parte da energia química do ATP (cerca de trinta por cento) em trabalho durante a contração muscular, e o restante é liberado como calor. Em alguns insetos e vertebrados endotérmicos, este mecanismo foi adaptado primariamente à produção de calor, o qual é denominado termogênese por tremor. Neste contexto, as contrações são ineficientes devido à ativação de um conjunto de músculos antagonistas, causando apenas tremor, e praticamente toda a energia proveniente da hidrólise do ATP é liberada como calor (BIANCO, 2000; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Outro sistema que leva à produção de calor, presente no músculo esquelético animal, envolve um ciclo de cálcio (Ca^{+2}) dependente de ATP entre o retículo sarcoplasmático (RS) e o citosol da célula. Uma enzima Ca^{+2} -ATPase presente na membrana do RS bombeia Ca^{+2} para o lúmen desta organela, utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP. Isso leva ao acúmulo de Ca^{+2} , o que gera um gradiente eletroquímico através da membrana do RS. Tal gradiente (energia osmótica) pode ser transformado em energia química e usada pela Ca^{+2} -ATPase para realizar o ciclo catalítico reverso, no qual o retorno do Ca^{+2} para o citosol pode ser acoplado a síntese de ATP a partir de ADP + Pi (fosfato inorgânico). A produção de calor nesse sistema relaciona-se tanto com o influxo quanto com o efluxo de Ca^{+2} . No primeiro caso, somente uma parte da energia da hidrólise é utilizada para bombear o Ca^{+2} para o interior do RS, a outra parte é perdida como calor. No segundo caso, o retorno do Ca^{+2} para o citosol, pode ser também desacoplado da síntese de ATP, de tal modo que a energia osmótica que seria utilizada para isto também é liberada como calor. Além disso, com a hidrólise de ATP, resultante desse ciclo, há um aumento de ADP citosólico, o que estimula a respiração mitocondrial, amplificando ainda mais a termogênese (MEIS, 2001).

Os mecanismos de produção de calor relacionados com o processo que leva à síntese de ATP e que são intimamente associados ao funcionamento mitocondrial, mais especificamente à CR, receberão maior atenção neste trabalho (ver próximos itens).

3.3 Mitocôndrias

Antes de se detalhar como a CR atua na produção de ATP e o seu papel em processos termogênicos, faz-se importante contextualizá-la, discorrendo sobre a organela onde a OXPHOS ocorre: a mitocôndria. Presente nas células eucarióticas, as mitocôndrias apresentam-se em quantidades variadas, de acordo com os tipos celulares, sendo em maior número naqueles com alta demanda energética ou em tecidos especializados à termogênese, como será visto posteriormente. A sua distribuição é aleatória dentro das células, porém, podem se concentrar mais em regiões que precisam de muita energia, como em filamentos contráteis de células musculares, que exigem muito ATP (EL-HATTAB *et al.*, 2018; PIMENTEL, 2013). Intimamente envolvida com a conversão de energia química, esta organela participa também da homeostase de cálcio, apoptose e regulação do ciclo celular, se relacionando não somente com doenças metabólicas, mas também com o envelhecimento e câncer (GRANDEMANGE; HERZIG; MARTINOU, 2009; SCHECKHUBER *et al.*, 2007; SUKHORUKOV *et al.*, 2012). Assim, disfunções mitocondriais podem comprometer funções do sistema nervoso, muscular esquelético e cardíaco, endócrino e até mesmo funções reprodutivas, dentre outras (EL-HATTAB *et al.*, 2018; PIMENTEL, 2013;).

A mitocôndria tem genoma próprio (mtDNA) que codifica uma pequena parte das proteínas mitocondriais (cerca de 13 polipeptídeos). O DNA nuclear codifica a maioria das proteínas que compõem esta organela, sendo assim, controlada por dois genomas de padrões de herança distintos (EL-HATTAB *et al.*, 2018). Com uma estrutura característica e formato alongado (na maioria das vezes, ver parágrafo abaixo), a mitocôndria é composta por duas membranas, a externa (ME) e a interna (MI), que se distinguem a nível estrutural e funcional e delimitam o espaço intermembranas (EIM), o qual quimicamente se assemelha ao citosol (HACKENBROCK, 1968; PALADE, 1952). A ME é mais permeável por ser enriquecida de porinas, permitindo que moléculas de até 5000 dáltons adentrem ao EIM. As maquinarias proteicas que nela se inserem são determinantes à forma da mitocôndria e atuam na comunicação organelar com a célula. Já a MI é mais impermeável e tem estrutura peculiar por formar invaginações, denominadas cristas, além de regiões adjacentes à ME, tendo, portanto, dois domínios. São nas cristas que estão inseridos preferencialmente os complexos multienzimáticos que compõem

a CR, sendo um deles a ATP sintase (Complexo V). No domínio de MI adjacente à ME, concentram-se transportadores e outras enzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial (EL-HATTAB *et al.*, 2018; FREY; MANNELLA, 2000; PFANNER *et al.*, 2014; PIMENTEL, 2013; WERNER; NEUPERT, 1972)

O espaço circundado pela MI é denominado matriz mitocondrial, onde estão ribossomos, cópias do mtDNA, RNAs transportadores, metabólitos intermediários e centenas de enzimas. Dentre estas estão as responsáveis pela oxidação de moléculas energéticas resultantes da glicólise, beta-oxidação, vias de metabolização de aminoácidos, e ciclo do ácido cítrico (do inglês, TCA).

Apesar dessa estrutura bem característica, sempre descrita pela literatura, estudos mais recentes têm se referido às mitocôndrias como uma “rede” de organelas membranosas extremamente dinâmicas (SEDLACKOVA *et al.*, 2018) e até mesmo como retículo mitocondrial, pelo fato de formarem filamentos tubulares que se interconectam em redes ramificadas. Tal arranjo reticular pode ser observado através de microscopia de fluorescência. No entanto, sabe-se que a morfologia mitocondrial é determinada por um equilíbrio entre processos de fusão e fissão, os quais são complexos e envolvem múltiplas proteínas. As cristas também têm o tamanho e o comprimento alterados em resposta a estímulos metabólicos, o que gera consequências na eficiência da CR. Além disso, a mitocôndria tem uma via de degradação própria, a mitofagia, capaz de selecionar organelas com perda de função. Defeitos nesta via causam defeitos estruturais e alterações na síntese de ATP, comprometendo as funções mitocondriais (SEDLACKOVA *et al.*, 2018; SUKHORUKOV *et al.*, 2012).

No que diz respeito à função bioenergética, faz-se importante entender que, para a conversão da energia química de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) provindas da alimentação em energia utilizável pela célula, essas são degradadas a aminoácidos, monossacarídeos e ácidos graxos. Depois, elas são oxidadas parcialmente, gerando principalmente acetil-CoA. Este metabólito entra no TCA, onde os produtos finais gerados serão o CO₂ (liberado da matriz para o citosol), o trifosfato de guanosina (GTP, que depois será convertido em ATP) e os carreadores de elétrons dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH) e flavina-adenina (FADH₂), que são as principais fontes alimentadoras da CR (ALBERTS *et al.*, 2010; NELSON; COX, 2014; PIMENTEL, 2013).

3.3.1 Cadeia respiratória e produção de calor via desacoplamento mitocondrial

A CR é formada principalmente por cinco complexos multienzimáticos (I, II, III, IV e V) inseridos na MI, os quais através da transferência de elétrons entre si, propiciada por reações de redução, desempenham a OXPHOS. Esta depende da energia dos elétrons gerados pelas vias que levam à oxidação de moléculas provenientes da alimentação, tais como glicólise, ciclo do ácido cítrico e beta-oxidação. Os elétrons, os quais são carregados por NADH e FADH₂, entram na CR através dos complexo I (NADH desidrogenase) e II (succinato desidrogenase), respectivamente, ou por outras vias, incluindo a glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (G3PDH) e ETF:Q oxidoredutase. Todos os elétrons convergem então à coenzima-Q (ubiquinol, em seu estado reduzido), são transferidos ao complexo III (citocromo bc1) e por intermédio do citocromo c chegam ao complexo IV (citocromo c oxidase), que reduz o oxigênio molecular à água. Na medida em que ocorrem essas reações de óxido-redução, ocorre também o bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando assim um potencial eletroquímico, cuja energia será disponível para a síntese de ATP pelo complexo V, a partir de ADP e Pi, conforme os prótons voltam para a matriz mitocondrial (LAROSA; REMACLE, 2018; MITCHELL, 1961). Este processo através do qual é gerado um circuito de prótons através da MI, ficou conhecido como teoria quimiosmótica, estabelecendo que a fosforilação do ADP seja acoplada a oxidação de substratos, de tal forma que a energia química advinda da alimentação, passa por transformações até ser conservada na forma de ATP (JASTROCH, 2010; NELSON; COX, 2014).

Entretanto, a eficiência dessas transformações energéticas não é completa. Em geral, apenas cerca de 70% da energia das ligações químicas da molécula de glicose é incorporada nas ligações fosfato-fosfato do ATP em condições aeróbicas, e o restante é dissipada como calor (BIANCO, 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Isto é, o processamento da energia pela OXPHOS na MI pode não ser perfeitamente acoplado à síntese de ATP. Acontece que os prótons podem retornar do EIM à matriz mitocondrial por vias adicionais ao complexo V, sem realização de trabalho, através de um “vazamento de prótons” ou “*proton leak*” (do inglês), gerando o desacoplamento mitocondrial. Desse modo, embora a transferência de elétrons e consequentemente o consumo de O₂ continuem, parte da energia que

seria acumulada para a síntese de ATP é perdida em forma de calor, constituindo um dos mais tradicionais mecanismos termogênicos (BIANCO, 2000; JASTROCH, 2010).

O vazamento protônico é resultante de dois processos: 1) constitutivo, o qual ocorre através da condutância basal de prótons, dependente da composição de ácidos graxos e da abundância de translocases de nucleotídeos de adenina (ANT) na MI; e 2) regulado/induzido, no qual a condutância de prótons é catalisada por proteínas específicas como as desacopladoras (do inglês, UCPs), que também podem ser constituintes da MI (DIVAKARUNI; BRAND, 2012; JASTROCH, 2010). Por exemplo, no tecido adiposo marrom de certos mamíferos, inclusive nos humanos, há uma elevada quantidade de mitocôndrias expressando UCP1 (também chamada de termogenina), o que torna este órgão especializado em produção de calor através da combinação da oxidação de moléculas de gorduras com a ineficiência na produção de ATP. Esta termogênese é muito importante para eutérios durante períodos muito frios e para manter a temperatura dos recém-nascidos. (CANNON; NEDERGAARD, 2004; NELSON; COX, 2014; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000).

Em busca da compreensão da importância do desacoplamento mitocondrial, outras UCPs, homólogas à UCP1 foram identificadas: em mamíferos, constituem uma família que inclui UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 (KRAUSS; ZHANG; LOWELL, 2005; RAMSDEN, *et al.*, 2010). Além de exercerem a função de termogênese em certos tecidos, as proteínas desacopladoras contribuem para que potencial eletroquímico da membrana mitocondrial esteja em boas condições para o funcionamento da OXPHOS (BIANCO, 2000).

Apesar das UCPs identificadas e mais estudadas até então serem de mamíferos (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000) e plantas (LALOI, *et al.* 1997), elas estão presentes também em artrópodes (SLOCINSKA *et al.*, 2011; SLOCINSKA *et al.*, 2012; DA-RÉ *et al.*, 2014) e em plantas (HANAK; JEZEK, 2001). Em *D. melanogaster*, já foram encontradas quatro UCPs (UCP4A, 4B, 4C e 5), dentre as quais UCP4C mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das moscas sob baixa temperatura (15°C), por promover respiração mitocondrial desacoplada da produção de ATP. Foi mostrado que linhagens de moscas que tiveram a expressão dessa proteína reduzida por *knockdown* apresentaram problemas no desenvolvimento, havendo uma redução drástica no número de larvas de terceiro

instar (L3) e ausência de adultos. Em contrapartida, nas linhagens com a expressão normal de UCP4C não foram observados esses fenótipos e as suas larvas L3 apresentaram temperatura 0,5°C acima da apresentada pelo meio circundante a 14°C, contrariamente às linhagens com *knockdown* da proteína. Ao que tudo indica, a produção de ATP de *Drosophila* é mantida majoritariamente pela glicólise durante os estágios larvais, já que UCP4C desacopla a mitocôndria da larva. Acredita-se que este seja um mecanismo evoluído como uma adaptação transitória, de modo a favorecer o desenvolvimento das larvas em baixas temperaturas. Uma vez que estas são bem menos móveis que os adultos e confinam-se em seus nichos específicos, o ATP necessário seria compensado pela glicólise, enquanto que o desacoplamento na CR assumiria função termogênica (DA-RÉ *et al.*, 2014).

O desacoplamento mitocondrial pode ainda ser explorado através de outras vias que convergem ao sistema de transferência de elétrons da CR. Insetos popularmente conhecidos como mamangaba-de-cauda amarela (*Bombus terrestris*) voam mesmo a temperaturas baixas e para isso pré-aquecem os músculos do voo. Foi mostrado que a G3PDH de fibras musculares de *B. terrestris* apresenta sensibilidade relativamente baixa à temperatura mais fria e na presença de seu substrato, o glicerol 3-fosfato (G3P) o consumo de O₂ é elevado mesmo na ausência de ADP (substrato do complexo V). A respiração desacoplada mantida exclusivamente por G3P foi aproximadamente 20 vezes maior do que aquela desacoplada também, mas suportada por intermediários que geram substratos ao complexo I da CR (piruvato e malato). Esse mecanismo é conhecido como “*leak respiration*” (do inglês), pelo fato de haver “*próton leak*”, como explicado anteriormente. Isto é, os prótons retornam do EIM para a matriz mitocondrial sem ser através da ATP sintase, há um aumento na atividade de transferência de elétrons, o que resulta no aumento da liberação de calor e favorece o aquecimento dos músculos desses insetos (MASSON *et al.*, 2017).

Notavelmente, a transferência de elétrons, fundamental à OXPHOS, também gera espécies reativas de oxigênio (ROS) - moléculas e radicais livres derivados do oxigênio que podem reagir com as macromoléculas que compõem a célula (proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos), comprometendo funções celulares. Assim, quando produzidas em excesso são tóxicas à célula e são consideradas uma das causas do envelhecimento. Dentre outros fatores que influenciam a produção de ROS estão condições de “sobrecarga” em algum dos

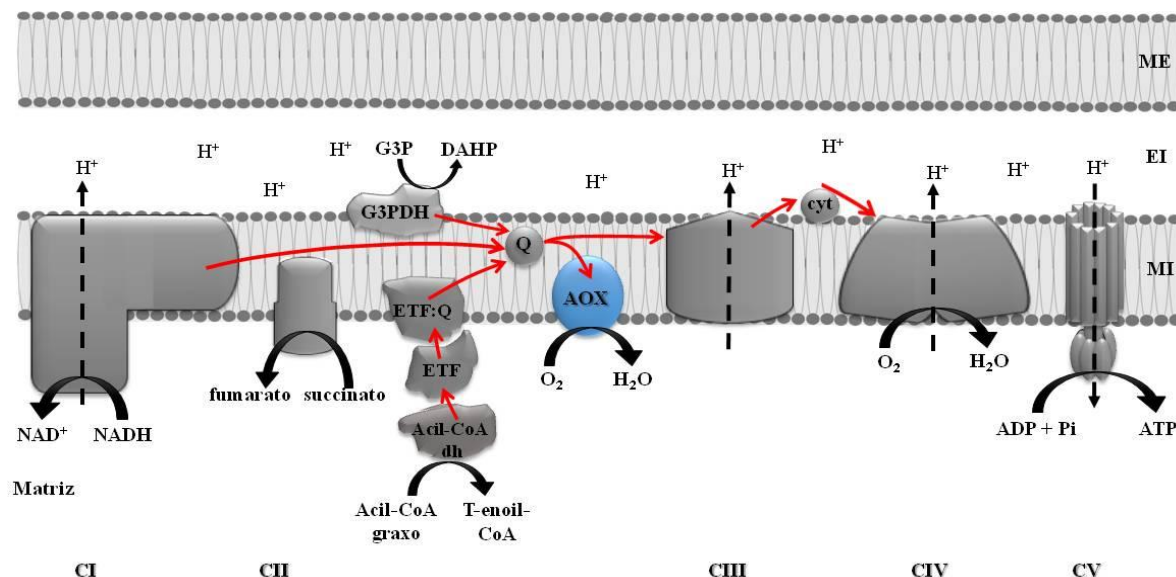
complexos respiratórios, favorecendo o estresse oxidativo, ou seja, a quantidade de ROS excede a capacidade celular de gerar uma resposta antioxidante (AON; CORTASSA; O'ROURKE, 2010; LAROSA; REMACLE, 2018; RAY; HUANG; ISUJI, 2012; SHEN; PERVAIZ, 2009). Nesse sentido, os mecanismos que auxiliam o fluxo de elétrons, como o vazamento de prótons, impedindo um elevado potencial eletroquímico, ajudam a evitar a formação de ROS. Entretanto, o nível destas media funções importantes na sinalização celular, atuando como mensageiros secundários em processos apoptóticos, expressão gênica, respostas imunes e cicatrização (DUNNILL *et al.*, 2017; PERILLO *et al.*, 2014; SHEN; PERVAIZ, 2009; TRACHOOTHAM *et al.*, 2008)

3.3.2 Enzimas alternativas da CR mitocondrial

Como já foi introduzido, enzimas alternativas da CR, presentes na maioria dos eucariotos, incluindo plantas, protozoários e vários metazoários (MCDONALD; VANLERBERGHE, 2004; MCDONALD; VANLERBERGHE, STAPLES, 2009), exercem funções de química redox semelhantes ao complexo I (no caso da ANDH) ou aos complexos III-IV, (no caso da AOX), porém sem realizarem bombeamento de prótons para o espaço intermembranas, não contribuindo assim à força próton-motriz que leva à produção de ATP. Diferentemente dos principais complexos que realizam transferência de elétrons na CR, as enzimas alternativas consistem de um único polipeptídeo, o qual é codificado exclusivamente pelo DNA nuclear (SAARI *et al.*, 2018).

AOX oxida o ubiquinol e reduz o oxigênio à água (Figura 1), podendo assim substituir parcialmente o segmento do citocromo c da CR (JUSZCZUK; RYCHTER, 2003). Sua estrutura descrita para *Trypanosoma brucei* e semelhantemente em plantas, estabelece que ela é uma proteína dimérica, com sítio ativo contendo um centro diferro e semi-integral de membrana, no caso, insere-se na MI. (ROGOV *et al.*, 2014; SHIBA *et al.*, 2013). Através de métodos de alinhamento de sequências e modelagem molecular, foi encontrada similaridade da AOX de *C. intestinalis* com essa estrutura também (ANDJELKOVIĆ *et al.*, 2015).

Figura 1. Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial na presença de AOX. Setas vermelhas indicam a direção da transferência de elétrons de NADH, succinato, G3PDH e ETF:Q para o O₂. Setas pontilhadas indicam bombeamento de prótons para EI. CI-CV, complexos I-V; Q, ubiquinol; AOX, oxidase alternativa; cit, citocromo c; MI, membrana interna; EI, espaço intermembranar, ME, membrana externa.



Fonte: Adaptado de Camargo *et al.* (2018).

A importância da AOX, principalmente em metazoários não é bem esclarecida. No entanto, em plantas sabe-se que ela atua evitando a formação de ROS e na manutenção da homeostase redox em situações estressantes (DAHALL *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016;). Outro papel bem estabelecido da AOX ocorre em plantas termogênicas, para as quais sua via alternativa de transferência de elétrons contribui à geração de calor em órgãos específicos. Parte da energia dos elétrons que chegam à CR, que seria conservada para produzir ATP, é perdida como calor (MEEUSE, 1975; MOORE *et al.*, 2013; RASMUSSEN; SOOLE; ELTHON, 2009). Na flor-de-lótus *N. nucifera*, em especial, cerca de 75% dos elétrons da CR convergem à via da AOX, fazendo com que a energia do transporte destes seja dissipada na forma de calor, possivelmente contribuindo para a volatilização de compostos importantes para a atração de insetos polinizadores (WATLING *et al.*, 2006). Semelhantemente, membros da família Araceae aumentam sua temperatura interna durante o florescimento (SEYMOUR *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2008) *Symplocarpus foetidus* (Liliopsida: Araceae), por exemplo, tem suas espádices aquecidas durante frio intenso, de modo a derreter o gelo em seu entorno e liberar

um odor fétido que atrai besouros (KNUTSON *et al.*, 1974). Além disso, sabe-se que o estresse ao frio ativa a AOX, mesmo em plantas consideradas não-termogênicas, tais como tubérculos de batata que, quando submetidos a 5°C, apresentaram um aumento de dez vezes na atividade da enzima em relação à condição controle de 25°C (BORECKÝ; VERCESI, 2005).

De um modo geral, a regulação da AOX, quer seja metabólica ou a nível de expressão gênica também não é totalmente entendida nos eucariotos, a exceção das plantas. Sabe-se até então que o acúmulo de ubiquinol (seu substrato) leva à sua ativação e, teoricamente, em condições fisiológicas não estressantes, AOX não está enzimaticamente ativa, pois a afinidade do complexo III pelo mesmo substrato é muito maior. Em vários organismos, AOX é ativada alostericamente por metabólitos, tais como o piruvato, que se acumulam sob situações de estresse respiratório/metabólico causado por defeitos na OXPHOS (SAARI *et al.*, 2018).

Embora presentes na maioria dos grupos do reino animal, os genes que codificam as enzimas alternativas não são encontrados em vertebrados e insetos, pelo fato de terem sido perdidos independentemente ao longo da evolução (MCDONALD; VANLERBERGHE, 2004; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009). Porém, o gene da AOX proveniente de *C. intestinalis*, representante de um grupo-irmão de Vertebrata, foi expresso transgenicamente nas mitocôndrias de moscas *D. melanogaster* (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; KEMPPAINEN, *et al.* 2014), camundongos (EL-KHOURY, *et al.*, 2013; SZIBOR *et al.*, 2017) e diversas células humanas em cultura (HAKKAART, G.A *et al.*, 2005; DASSA *et al.*, 2009) com bastante sucesso. A ideia era testar se a via alternativa conferida pela AOX poderia atuar como uma válvula de escape de elétrons em condições de estresse respiratório ou sobrecarga dos complexos III e IV, reduzindo o nível de ROS e reestabelecendo o consumo de oxigênio. Este conceito tem sido explorado desde então em busca de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças mitocondriais (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; KEMPPAINEN, *et al.* 2014). Em *D. melanogaster*, as linhagens expressando AOX não apresentaram problemas notáveis na viabilidade dos estágios de desenvolvimento e reprodução à temperatura padrão de laboratório (25°C), sobreviveram a níveis tóxicos de antimicina A e cianeto (inibidores dos complexos III e IV, respectivamente) (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009), e tiveram fenótipos relacionados a deficiências no complexo IV resgatados (KEMPPAINEN *et al.*, 2014). Além disso, linhagens de

moscas mutantes para o gene *dj-1 β* (modelo para a doença de Parkinson) tiveram defeitos locomotores mitigados (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009) e linhagens que expressam peptídeos beta-amilóides humanos (modelo para a doença de Alzheimer) tiveram um aumento na longevidade, a qual na ausência de AOX é bem curta (EL-KHOURY *et al.*, 2016). A expressão da AOX nos demais sistemas heterólogos, principalmente em células humanas em cultura (DASSA *et al.*, 2009; EL-KHOURY, *et al.*, 2013; HAKKAART, *et al.*, 2005), também gerou resultados muito similares e promissores no que diz respeito à remediação de defeitos mitocondriais em modelos experimentais.

Outros efeitos positivos inesperados da expressão da AOX foram encontrados, tais como a prevenção de disfunções ontogenéticas, incluindo o fenótipo de fenda torácica em *D. melanogaster*, correspondente ao fenótipo de lábio leporino em humanos (ANDJELKOVIĆ; KEMPPAINEN; JACOBS, 2016). Em contrapartida, disfunções mitocondriais claras resultantes de mutações que levam a falhas na replicação do DNA (RODRIGUES *et al.*, 2018) ou na síntese proteica intramitocondrial (KKEMPPAINEN; KEMPPAINEN; JACOBS, *et al.*, 2014) não foram amenizadas pela AOX, demonstrando que há limitações de seu uso. Além disso, efeitos negativos da expressão de AOX já foram observados, como defeitos reprodutivos em drosófilas machos. Estes não acumulam eficientemente espermatozoides maduros na vesícula seminal, o que os coloca em desvantagem quando testados em competição de esperma com machos controles (SAARI *et al.*, 2017). É plausível que muitos desses efeitos fenotípicos estejam provavelmente envolvidos à diversidade de papéis que a mitocôndria exerce no organismo. Porém, os processos biológicos básicos desencadeados pela expressão da AOX não estão precisamente elucidados, o que salienta a necessidade de uma investigação aprofundada da biologia desta enzima em metazoários, principalmente em condições que mimetizam a natureza.

3.4 Uso de *Drosophila melanogaster* como organismo-modelo

D. melanogaster é um pequeno inseto que desde o início do século passado tem sido muito utilizado como organismo modelo em biologia, propiciando grandes avanços em conjunto com várias técnicas de biologia celular e de manipulação genética que foram desenvolvidas. Desde o ano 2000 esse organismo tem o seu

genoma completamente sequenciado, revelando que muitos dos seus genes são ortólogos aos de mamíferos, tais como os que codificam proteínas mitocondriais (FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 2007)

Além disso, *D. melanogaster* tem um ciclo de vida curto, com estágios de desenvolvimento bem definidos, sendo relativamente fácil obter um grande número de indivíduos, levando-se em conta que cada fêmea ovipõe cerca de 100 ovos por dia. Estes passarão por um processo de embriogênese, subdividido em 17 estágios que duram cerca de 24 horas à temperatura de 25°C (CAMPOS-ORTEGA; HARTENSTEIN, 1985; FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 2007). O último estágio perdura até a eclosão do embrião, originando as larvas de primeiro instar (L1). L1 alimentam-se na superfície da dieta onde os ovos foram colocados e crescem de forma que após mais 24 horas, aproximadamente, são larvas de segundo instar (L2), adentram-se ao meio de cultivo até atingirem o próximo instar, L3. Quando as larvas L3 estão maduras, começam a sair da dieta, em busca de um substrato seco (em laboratório consiste na parede do frasco onde é feito o cultivo), fase que são denominadas L3 errantes, para então transformarem-se em pupas num espaço de tempo variável entre 24 a 48 horas. As pupas são imóveis e inicialmente apresentam-se com coloração branco amarelado, tornando-se progressivamente mais escuras, conforme as larvas vão se metamorfoseando. O estágio pupal dura aproximadamente 100 horas e é subdividido em 15 estágios (P1 a P15). No último dia de pupa, já é possível notar a mosca adulta formada no interior da pupa (imago), que logo após atingirem P15 emergem, alcançando, portanto um tempo médio de desenvolvimento de ovo a adulto de 10/11 dias (BAINBRIDGE; BOWNES, 1981; FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 2007; TYLER, 2000).

Por se constituir um inseto holometábolo (i.e. que passa por metamorfose completa), as suas diversas fases de desenvolvimento implicam em alterações metabólicas intensas, uma vez que o organismo passa de larvas alimentadoras a adultos extremamente ativos, voadores e reprodutores. Durante a fase de pupa, para que a metamorfose ocorra, há histólise e reestruturação de tecidos, arquitetando todo o organismo o qual, posteriormente, originará a mosca. Embora se imagine que a metamorfose consuma uma elevada quantidade de energia, sabe-se que a taxa metabólica na fase pupal é relativamente baixa. Assim, quando medida durante larva, pupa e adulto, ela forma uma curva em “U” (curva metabólica em U), indicando que a restrição energética é inerente ao ciclo do organismo para o

sucesso da metamorfose. As reservas energéticas adquiridas pela alimentação das larvas abastecem todo o desenvolvimento e sustentam até o adulto recém-emergido, já que este passa as suas primeiras oito horas sem se alimentar (CHIANG, 1963; MERKEY *et al.*, 2011).

As larvas, então, armazenam muita energia, apresentando um crescimento acelerado, através de um metabolismo majoritariamente glicolítico, ou seja, elas utilizam glicólise aeróbica para produção da maior parte do ATP. Já foi mostrado que, em torno de 12 horas previamente ao fim da embriogênese, é desencadeada uma “programação metabólica”, onde o receptor relacionado ao estrogênio de *Drosophila* (dERR) leva a sobreexpressão transcricional de vários genes que codificam enzimas atuantes na glicólise (TENNESSEN *et al.*, 2014). É importante ressaltar, que a mitocôndria também exerce uma função importante nesse contexto, garantindo que sejam gerados precursores de vias biossintética. Através da CR, carreadores de elétrons são reoxidados, os quais são cruciais para o funcionamento do TCA, ciclo que processa parcialmente os precursores que serão utilizados para biossíntese de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos. Interessantemente esse metabolismo (larval) é típico de células proliferativas, como as cancerígenas e é conhecido também como efeito Warburg (TENNESSEN *et al.*, 2014; TENNESSEN *et al.*, 2011; VANDER HEIDEN CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG 1956). Diante desse panorama, somado às limitações impostas pelos estudos com células em cultura (os quais não permitem respostas sistêmicas), a larva de *D. melanogaster* tem sido cogitada como um modelo animal importante, permitindo que o crescimento e a proliferação celular sejam explorados a nível genético e regulatório e entendidos no contexto da fisiologia animal (TENNESSEN *et al.*, 2014; TENNESSEN *et al.*, 2011).

Embora a *D. melanogaster* seja mais conhecida como modelo nos campos de estudos em neurobiologia, regulação e expressão gênica, longevidade, comportamento, genética de populações, dentre outros (FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 2007), ela tem ocupado um espaço importante em estudos termorregulatórios de ectotérmicos (DILLON *et al.*, 2009). Muito do que se sabe sobre a termorregulação em ectotérmicos foi estudado em répteis, principalmente em lagartos, que são animais de monitoramento e mensuração da temperatura corpórea relativamente fáceis no campo. Porém, este grupo de organismos apresenta algumas limitações, principalmente no que diz respeito à correlação da termorregulação com a aptidão

para inferência do valor adaptativo, uma vez que estudá-los a nível populacional seria dificultoso e levaria muito tempo. Neste caso, insetos se mostram muito mais interessantes para estudos desse tipo, uma vez que são criados fácil e rapidamente em laboratórios, têm o desenvolvimento bem compreendido, e permitem-se averiguar efeitos de genes específicos (DILLON *et al.*, 2009).

Considerando a variedade de ferramentas moleculares hoje existentes e o conjunto de conhecimentos amplamente construído sobre *D. melanogaster*, este organismo também se mostra muito útil para estudos relacionados à termorregulação. A literatura aponta que várias bases neurobiológicas da sensação térmica são bem caracterizadas em *Drosophila*, assim como muitas respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas à variação térmica. É importante lembrar ainda que o seu desenvolvimento é diretamente influenciado pela temperatura, o que o torna um modelo interessante para averiguar efeitos térmicos. Portanto, *D. melanogaster* se constitui um sistema biológico líder para as mais diversas investigações em biologia de metazoários (DILLON *et al.*, 2009)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens

As linhagens de moscas utilizadas foram desenvolvidas e/ou cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Howard T. Jacobs (Universidade de Tampere, Finlândia) e foram retrocruzadas no *background* genético w^{1118} por pelo menos 6 gerações. Elas foram mantidas e os experimentos realizados em dieta padrão do Laboratório de Biologia Mitocondrial do Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, composta por 3,5% de extrato de levedura, 3% de glicose, 3% de melaço, 1,5% de sacarose (p/v), 1,5% de farinha de milho, 1% de farinha de soja, e 1% de ágar, 1% de gérmen de trigo, 0,5% de ácido propiônico e 0,1% de nipagin (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009). A expressão de AOX foi obtida com diferentes sistemas de expressão transgênica:

a) sistema constitutivo *tubulina*-AOX (KEMPPAINEN, *et al.*, 2014), no qual as moscas expressam o transgene da AOX sob controle do promotor da α -*tubulina* em níveis que variam de baixos a moderados, de acordo com o número de cópias do transgene (Quadro 1);

b) sistema induzível *UAS/GAL4* (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009), através do qual moscas que apresentam o transgene da AOX controlado pelo promotor *UAS* (*UAS-AOX*) são cruzadas com moscas que expressam o fator de transcrição *GAL4* (*daGAL4*), proveniente do levedo *Saccharomyces cerevisiae*. *GAL4* ativa o promotor *UAS* na prole gerada, levando a expressão ubíqua da AOX em níveis moderados e altos (Quadro 1).

Quadro 1: Descrição resumida das linhagens transgênicas utilizadas que expressam a AOX funcional (linhagens AOX). Linhagens com os sistemas de expressão, *tubulina-AOX* e *UAS/GAL4*, apresentam uma construção em homozigose nos cromossomos indicados, contendo a sequência do promotor α -*tubulina* e *UAS*, respectivamente, fundida ao gene da AOX de *C. intestinalis*.

Sistema de expressão	Genótipo	Inserção transgênica	Nível relativo de expressão de AOX*
Constitutivo <i>tubulina-AOX</i>	<i>tubAOX</i> ³⁵	cromossomo X	baixo
	<i>tubAOX</i> ¹¹²	cromossomo 2	baixo
	<i>tubAOX</i> ⁷	cromossomo 3	baixo
	<i>2xtubAOX</i>	cromossomos 2 e 3	moderado
	<i>3xtubAOX</i>	cromossomos X, 2 e 3	moderado
Induzível <i>UAS/GAL4</i>	<i>UAS-AOXwt</i> ^{8.1}	cromossomo 2	moderado
	<i>daGAL4</i>		
	<i>UAS-AOX</i> ^{F6} / <i>daGAL4</i>	cromossomo 2	alto

* Níveis descritos de acordo com Fernandez-Ayala *et al.* (2009); Kemppainen, *et al.* (2014); Andjelkovic *et al.* (2015); Saari *et al.* (2017).

Como controles experimentais foram utilizadas, respectivamente, as linhagens *w1118* e *UAS-AOXmut*^{2nd}/*daGAL4*. Esta última carrega uma versão não-funcional da AOX, com mutações no sítio ativo da enzima (ANDJELKOVIC *et al.*,

2015). É importante ressaltar que as linhagens com o sistema induzível *UAS/GAL4* foram utilizadas apenas nos testes de resistência ao frio, mas não nos ensaios de desenvolvimento. Isso foi determinado porque o funcionamento do próprio fator de transcrição *GAL4* varia de acordo com a temperatura, apresentando uma atividade mínima a 16°C e máxima a 29°C (DUFFY, 2002), o que inviabilizaria as análises.

4.2 Análises fenotípicas

4.2.1 Ensaios de desenvolvimento

Ovos das diversas linhagens foram coletados durante ≤ 24 horas em frascos contendo 20 fêmeas pré-acasaladas e 10 machos, em dieta padrão, a 25°C. Após descarte dos adultos, os ovos foram submetidos às temperaturas de 12, 15, 18, 25, 29 e 31°C, onde eles se desenvolveram com fotoperíodo controlado (12h claro/12h escuro) e controle manual de umidade. Os ensaios foram feitos em triplicatas, exceto para os experimentos a 12 e 15°C, que foram realizados em duplicatas. Cada repetição foi composta por quatro frascos de cada linhagem contendo de 40 a 170 ovos, cujo desenvolvimento foi monitorado diariamente. Os parâmetros analisados foram:

- a) o tempo médio de desenvolvimento de ovo até pupa e desta até o estágio adulto, através da contagem diária do número de pupas e adultos surgidos por frasco de cultura;
- b) a viabilidade dos ovos e larvas, através do cálculo da porcentagem de ovos que alcançaram o estágio pupal por frasco de cultura;
- c) a viabilidade das pupas, através do cálculo do número de adultos que emergiram em relação ao número de pupas contabilizadas por frasco de cultura.

4.2.2 Tratamento com gelo

Para testar a resistência ao frio, 4 frascos sem dieta, contendo 10 indivíduos adultos, foram submetidos ao gelo (0°C) e o tempo levado para que todas as moscas de cada frasco fossem totalmente imobilizadas foi contabilizado. Para computar o tempo de recuperação após estresse causado pelo gelo, 2 frascos contendo 5 indivíduos adultos cada foram submetidos a 1 e 2h a 0°C e então

transferidos a 25°C, até que cada mosca conseguisse se manter em pé novamente. Os indivíduos amostrados em ambos os testes tinham a mesma idade (aproximadamente 4 dias pós-emergência), estavam aclimatados a 25°C, e foram coletados com pelo menos 48 horas de antecedência ao experimento para evitar possíveis alterações metabólicas causadas pela anestesia por CO₂, método utilizado para seleção e coleta dos adultos (COLINET; RENAULT, 2012). Os testes foram feitos em triplicatas, e em cada teste de resistência também foram feitas três repetições técnicas.

4.3 Análises de respirometria

Através do sistema de respirometria de alta resolução Oxygraph-2k (O2k, Oroboros Instruments), foi avaliado o consumo de oxigênio mitocondrial e a razão ADP/O de homogeneizados de larvas L3 a 12, 15 e 25°C. Os procedimentos experimentais foram precedidos da lavagem das 2 câmaras do sistema pelo menos 3 vezes com álcool anidro (99,5%) e uma vez com água deionizada, e da estabilização do sinal à temperatura adequada após adição do tampão de ensaio (120mM KCl, 5mM KH₂PO₄, 3mM Hepes, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 2% BSA, pH ajustado a 7,4). O homogeneizado foi preparado por maceração de 20 larvas L3 errantes em 1000µl de tampão de isolamento (250mM sacarose, 5mM Tris HCl, 2mM EGTA, pH ajustado a 7,4) com o uso de um homogenizador de vidro manual. Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial, 200µl do homogeneizado de larvas foram adicionados em cada uma das câmaras contendo 1800µl do tampão de ensaio. O restante de cada amostra (~600 µl) do homogeneizado foi armazenado a -20°C para posterior quantificação proteica (ver item 3.3 abaixo). Após o fechamento das câmaras, foram fornecidos substratos oxidáveis para suprir elétrons à CR: 5µl 2M piruvato/prolina (concentração final de 5mM), 7,5µl 0,4M malato (1,5mM) e 80µl 0,65M glicerol-3-fosfato (26mM). A respiração máxima acoplada foi estimulada pela adição de 4µl 0,5M adenosina difosfato (ADP, 1mM), substrato da ATP-sintase, e posteriormente inibida na seguinte ordem. Na câmara A, 2µl 0,05M antimicina A (0,05mM) e 4µl 0,1M propilgalato (0,2mM) foram usados para inibir primeiramente o complexo III e depois AOX, o que permitiu inferir o consumo de oxigênio realizado exclusivamente pela AOX, através da diferença entre o consumo de oxigênio “após adição de antimicina A” e “após a adição de propilgalato”. Já na câmara B,

procedeu-se inversamente: primeiramente, foi adicionado o inibidor da AOX, para averiguar se e quanto esta enzima poderia participar na respiração mitocondrial quando a CR está funcional. Para isso, subtraiu-se o valor de consumo de oxigênio “após adição de propilgalato” do valor “após a adição de antimicina A”. Todos os valores de respiração obtidos foram normalizados pela subtração do valor de consumo de oxigênio após inibição final do complexo I com 1µl 0,01M rotenona (0,005mM).

Para calcular a razão ADP/O e inferir a síntese de ATP, foram usados 1900µl de tampão de ensaio e 100µl do homogeneizado de larvas. Após adição dos mesmos substratos oxidáveis descritos acima, nas mesmas concentrações, foi adicionada uma quantidade limitante de ADP (32µl 5mM estoque; 160 nmol final) para ser totalmente fosforilado pela ATP sintase. O valor da variação na concentração de oxigênio antes e após a fosforilação do ADP foi então multiplicado pelo número de átomos de oxigênio (2) e pelo volume da câmara (2ml) para inferir quantas moléculas de ADP são fosforiladas por oxigênio consumido.

O nível de acoplamento entre a respiração e a fosforilação do ADP foi estimada através do cálculo da taxa de controle respiratório (do inglês, RCR), onde o valor do consumo de oxigênio gerado pela adição dos mesmos substratos oxidáveis descritos acima e de 4µl 0,5M ADP (1mM, saturação), denominado de respiração mitocondrial de estado 3, foi dividido pelo valor do consumo após inibição da ATP-sintase com 1µl 25µM oligomicina (0,0125µM), denominado respiração mitocondrial de estado 4 (MORTON; BARNES; ZYSKOWSKI, 1996). Em todos os valores de respiração foi subtraído o valor de consumo de oxigênio após inibição dos complexos I e I, respectivamente com 1µl 0,01M rotenona (0,005mM) e 2µl 0,1M cianeto de potássio KCN (0,1mM).

4.3.1 Quantificação proteica

A quantificação proteica foi feita através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), que permite determinar a concentração de proteínas totais das amostras, fornecendo valores que foram utilizados pelo programa do oxígrafo O2k para estimar o consumo de oxigênio por mg de proteínas totais.

O método exige que seja feita uma curva padrão, por meio de uma diluição seriada de albumina do soro bovino (do inglês, BSA) com água *Milli-Q*, nas

concentrações 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625mg/ml, das quais utilizou-se uma amostra de 10µl de cada. Como branco, foram utilizados 10µl do tampão de isolamento. As amostras de homogeneizados de larvas foram diluídas 10X em água *Milli-Q* e delas foram utilizados 10µl em duplicatas. Em todas as amostras foram adicionados 200µl do reagente de Bradford e a quantificação foi feita utilizando o iMark™ Microplate Absorbance Reader, a 595nm de comprimento de onda.

4.4 Termografia de infravermelho

Uma câmera termográfica sensível à radiação infravermelha (Flir SC660; Suíça) pertencente ao laboratório da Prof^a. Dr^a. Kênia Cardoso Bícego, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP, foi utilizada para gerar dados diretos de produção de calor. Cada experimento foi composto por 20 larvas L3 de cada linhagem indicada, aclimatadas a 25°C, as quais foram transferidas dentro de placas de *Petri* encapadas por fita crepe (para evitar reflexão do material) para uma incubadora com a temperatura controlada de 12°C. Em seguida iniciou-se a captura de imagens de 5 em 5 segundos por um período de 1 hora. Os dados foram analisados com auxílio do software Therma Cam Researcher 2.10.

4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram processadas através do software SAS University Edition para a realização do teste *a posteriori* de Tukey, precedido da análise de variância ANOVA simples. Testes t de *Student* foram feitos através da ferramenta de análises de dados do Microsoft Excel.

5 RESULTADOS

5.1 A expressão de AOX aumenta as taxas de viabilidade dos ovos/larvas e pupas em baixas temperaturas

Para iniciar os testes sobre o papel termogênico da AOX em *D. melanogaster*, analisamos as linhagens de expressão constitutiva *tubAOX* durante o

desenvolvimento de ovo até a fase adulta, através do cálculo da viabilidade dos ovos/larvas (Figura 2A) e pupas (Figura 2B). O intuito foi averiguar se, nas temperaturas baixas, as linhagens transgênicas se mostrariam com taxas de viabilidade mais altas em relação à linhagem controle, enquanto que em temperaturas altas o inverso pudesse ser observado. Claramente, notamos que a expressão da AOX foi capaz de amenizar efeitos do estresse térmico, principalmente o frio (Figura 2), de tal forma que as taxas de viabilidade caíram menos com a variação da temperatura. Às temperaturas de 18°C e 25°C, as taxas de viabilidade dos ovos/larvas e das pupas foram relativamente altas e não se diferenciaram substancialmente dentre todas as linhagens. Assim, nestas temperaturas consideradas favoráveis ao cultivo de drosófilas, a expressão da enzima AOX não levou a uma resposta fenotípica aparente positiva ou negativa ao desenvolvimento das linhagens, das quaispudessem ser inferidas alterações metabólicas.

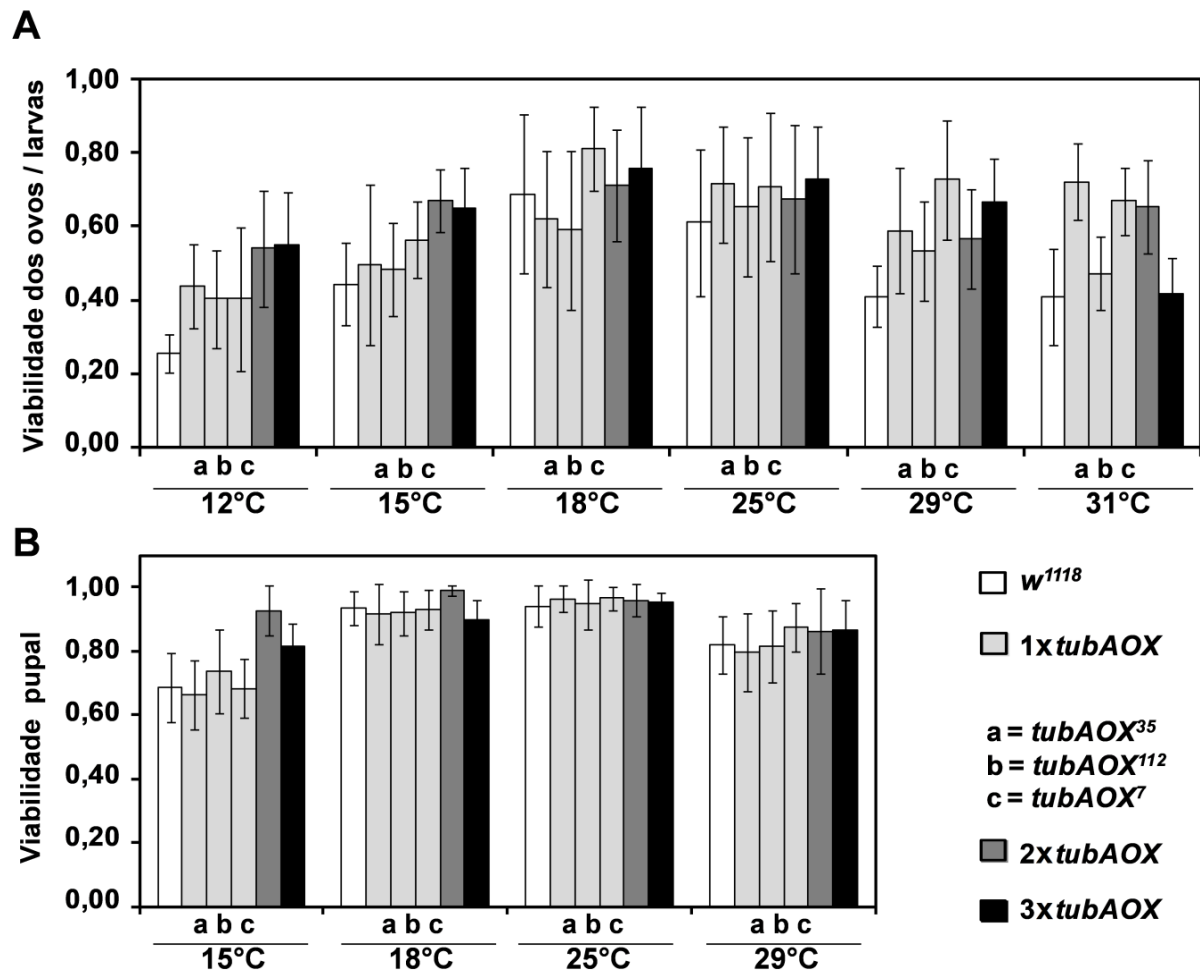
Quando submetidas a 15°C, as linhagens AOX com duas e três cópias do gene tiveram as taxas de viabilidade dos ovos/larvas significativamente mais altas ($0,65 \pm 0,11$) do que o controle w^{1118} ($0,44 \pm 0,11$). As linhagens com apenas uma cópia do gene da AOX, apresentaram taxas intermediárias, que não se diferenciaram estatisticamente das demais (APÊNDICE A e B). Além disso, nós observamos uma queda na viabilidade pupal de todas as linhagens (Figura 2), exceto *2xtubAOX* e *3xtubAOX*, que tiveram taxas superiores ou próximas a 0,80, relativamente altas para tal condição térmica.

Interessantemente, o resultado a 12°C se mostrou com um padrão semelhante ao de 15°C, porém mais intenso para a viabilidade dos ovos/larvas: todas as linhagens AOX tiveram taxas de viabilidade superiores a 0,40, sendo que *2xtubAOX* e *3xtubAOX* tiveram mais vantagens, com taxas próximas a 0,55. A linhagem controle sofreu mais com o estresse térmico pelo frio e apresentou uma taxa de 0,29. No entanto, nenhum indivíduo de nenhuma linhagem atingiu o estágio adulto, sendo a viabilidade pupal igual a 0..

Ao contrário do esperado, os resultados da viabilidade dos ovos/larvas obtidos a temperaturas altas indicaram certa vantagem às linhagens AOX (Figura 2A). As taxas destas foram mais altas a 29°C, sendo que algumas foram estatisticamente diferentes de w^{1118} (APÊNDICE A). Quanto às pupas, todas se mostraram com viabilidades muito semelhantes (Figura 2B), com cerca de 80% emergindo a adultos. A 31°C é aparente que a linhagem controle manteve-se com a

viabilidade dos ovos/larvas tão baixa quanto a 29°C. A maioria das linhagens AOX tiveram taxas elevadas, em torno de 0,65, porém a taxa de *3xtubAOX* foi tão baixa quanto a do controle. Já a viabilidade pupal foi praticamente nula para todas as linhagens, com pouquíssimas moscas chegando ao estágio adulto. Isso demonstrou que tal condição térmica já é extremamente limitante ao desenvolvimento de *D. melanogaster*.

Figura 2. Viabilidades dos ovos/larvas (A) e das pupas (B) às temperaturas indicadas. As taxas foram calculadas como o número de pupas/ número de ovos e número de adultos/número de pupas, respectivamente. Os valores representam a media +/- desvio padrão (DP) de 2-4 repetições biológicas, com 4 frascos de cada linhagem por repetição



Fonte: Adaptado de Saari *et al.* (2018).

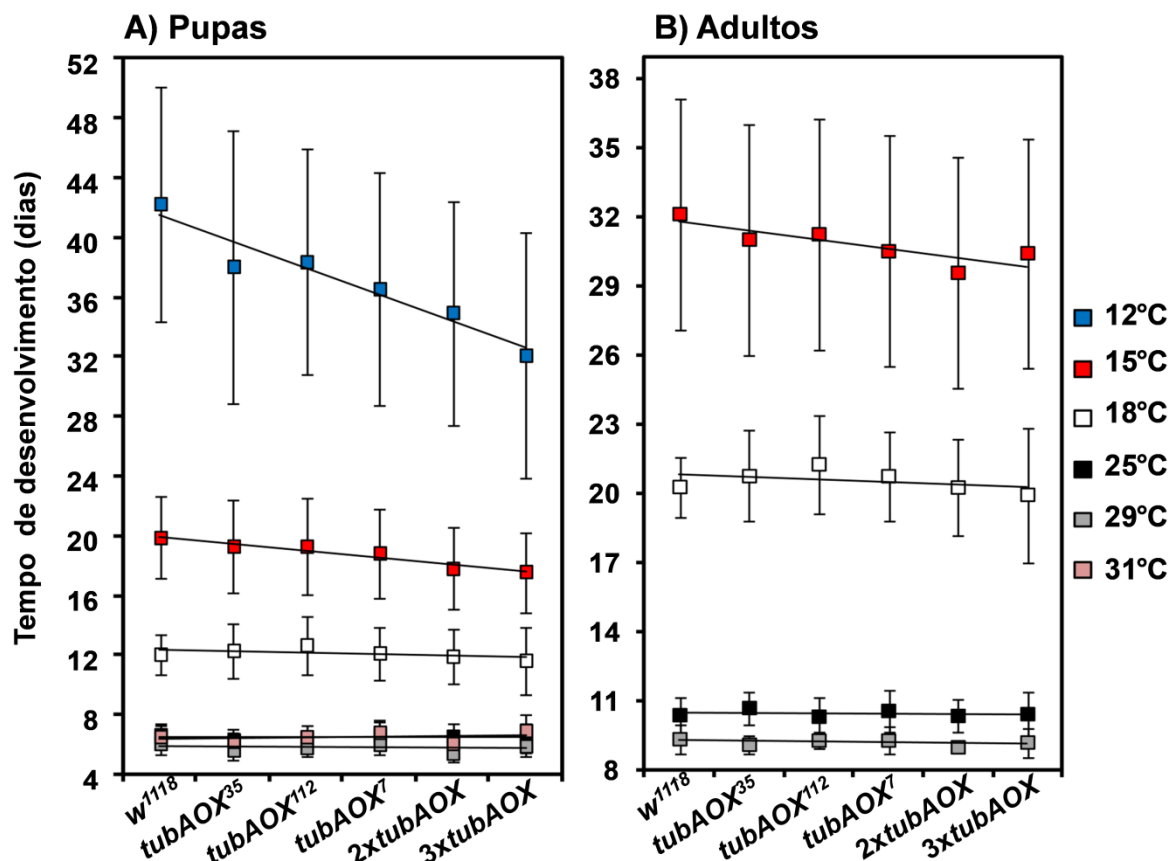
Em conjunto, os dados de viabilidade indicaram que a expressão de AOX mitiga os efeitos do estresse térmico causado pelo frio em *D. melanogaster*, o que estaria de acordo com a hipótese de que AOX produz calor. Porém, em altas temperaturas este possível efeito termogênico não afetou negativamente as taxas de viabilidade, uma vez que a 31°C AOX também concedeu vantagens a certas linhagens. De um modo geral, AOX amenizou os efeitos causados por ambos extremos de temperaturas para o desenvolvimento das moscas.

5.2 AOX acelera o desenvolvimento de maneira dose-dependente em baixas temperaturas

Como a temperatura afeta diretamente o desenvolvimento em insetos, medimos o tempo médio de desenvolvimento das linhagens *tubAOX* nas seis temperaturas, com a hipótese de que em baixas temperaturas, as linhagens AOX se desenvolveriam mais rapidamente. De fato, nossos resultados mostram que quanto mais baixa a temperatura, mais a AOX acelerou o desenvolvimento das moscas: isso ocorreu de maneira dose-dependente (Figura 3) e foi testado estatisticamente (APÊNDICE C e D).

Enquanto que a 25, 29 e 31°C o tempo de desenvolvimento foi semelhante entre todas as linhagens, a 18°C as larvas das linhagens *2xtubAOX* e *3xtubAOX* se desenvolveram mais rapidamente em pupas (Figura 3A), tendência que acabou sendo refletida no tempo de desenvolvimento dos adultos (Figura 3B). A 15°C, isso foi mais evidente: larvas *2xtubAOX* e *3xtubAOX* se desenvolveram com 2 dias de antecedência, aproximadamente, o que refletiu também no desenvolvimento dos adultos. Embora a 12°C nenhum adulto tenha emergido em qualquer uma das linhagens, as pupas daquelas com duas e três cópias do gene da AOX se desenvolveram cerca de 9 dias mais rapidamente do que o controle. Mais uma vez, estes resultados demonstram que AOX mitiga os efeitos do frio durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*, mas que não interfere em temperaturas elevadas.

Figura 3. Tempo de desenvolvimento de ovo até pupa (A) e de ovo até adulto (B) das linhagens AOX e controle às temperaturas indicadas. Os valores representam médias +/- DP de 2-4 repetições com 4 frascos de cada linhagem por repetição.

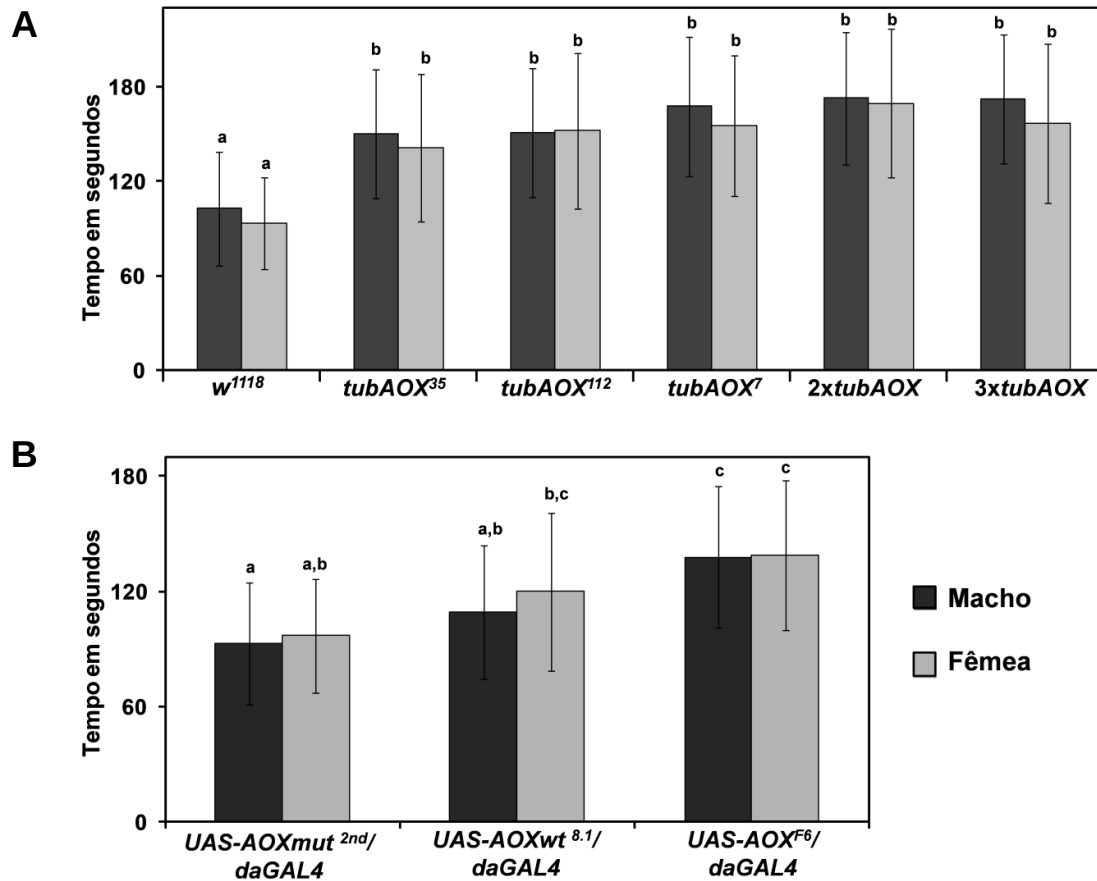


Fonte: Adaptado de Saari et al. (2018)

5.3 AOX proporciona maior resistência e acelera a recuperação após exposição prolongada ao gelo

Em adultos de linhagens AOX verificamos se estes poderiam exibir algum fenótipo capaz de indicar o aumento da temperatura interna. Para isso, medimos o tempo levado para que machos e fêmeas ficassem totalmente imobilizadas em frio intenso (0°C), com a hipótese de que a expressão de AOX aumentaria esse tempo. Os resultados para as linhagens *tubAOX* foram evidentes (Figura 4): enquanto *w¹¹¹⁸* (controle) foi imobilizada em menos de dois minutos em média, as linhagens *tubAOX* exibiram o fenótipo característico de imobilização devido ao estresse causado pelo frio em aproximadamente três minutos.

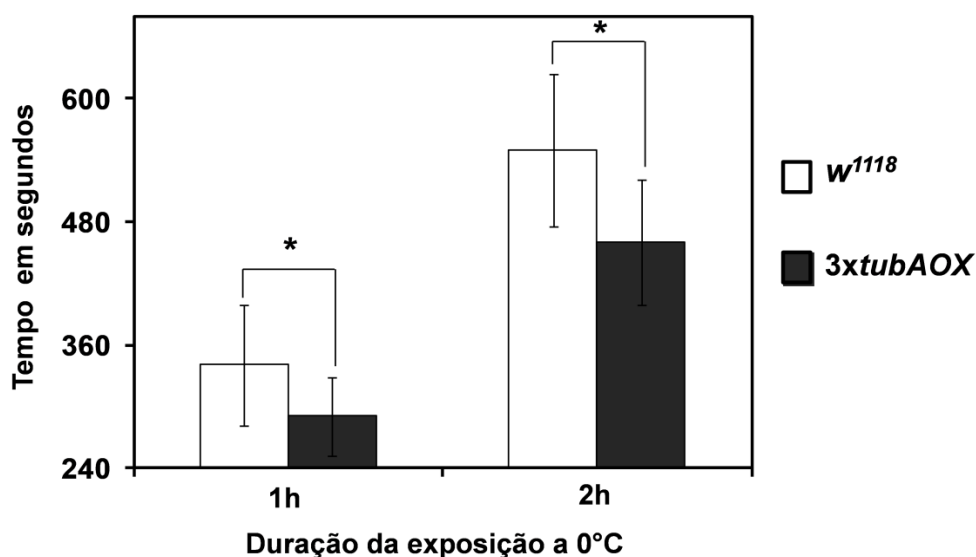
Figura 4: Tempo levado para completa imobilização no gelo das moscas *tubAOX* (A) e *UAS-AOX/daGAL4* (B) adultas e seus respectivos controles. Os valores representam as médias $\pm$ DP de três repetições biológicas, com três repetições técnicas cada. Foram usados grupos de 10 moscas por frasco do sexo e genótipo indicados, em um total de 4 frascos. As letras “a-b” indicam classes estatísticas diferentes ($P < 0,05$), de acordo com o teste *a posteriori* de Tukey, precedido de uma ANOVA simples.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Averiguamos posteriormente o tempo de recuperação individual das moscas após serem expostas ao frio intenso (Figura 5). Após permanecerem 1 e 2h a 0°C, as moscas que expressavam AOX se recuperaram de forma mais acelerada, com um adiantamento de aproximadamente 1 e 1,5 min, respectivamente, em relação à linhagem controle. Com tais resultados, que ainda devem ser testados estatisticamente, ficou explícito que AOX alivia efeitos do estresse ao frio também durante o estágio adulto. Os mecanismos pelos quais isso ocorre demandam maior investigação, mas os dados fenotípicos em geral estão de acordo com a hipótese de geração de calor pela AOX em *D. melanogaster*.

Figura 5. Tempo levado para completa recuperação das moscas após imobilização no gelo durante os tempos indicados. Os valores representam as médias $\pm$ DP do tempo de recuperação individual de machos dos genótipos amostrados em três repetições biológicas compostas por 2 frascos sem dieta e com 5 indivíduos cada. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($P < 0,01$) comparadas com o controle para cada tempo de exposição, de acordo com o teste t de student.

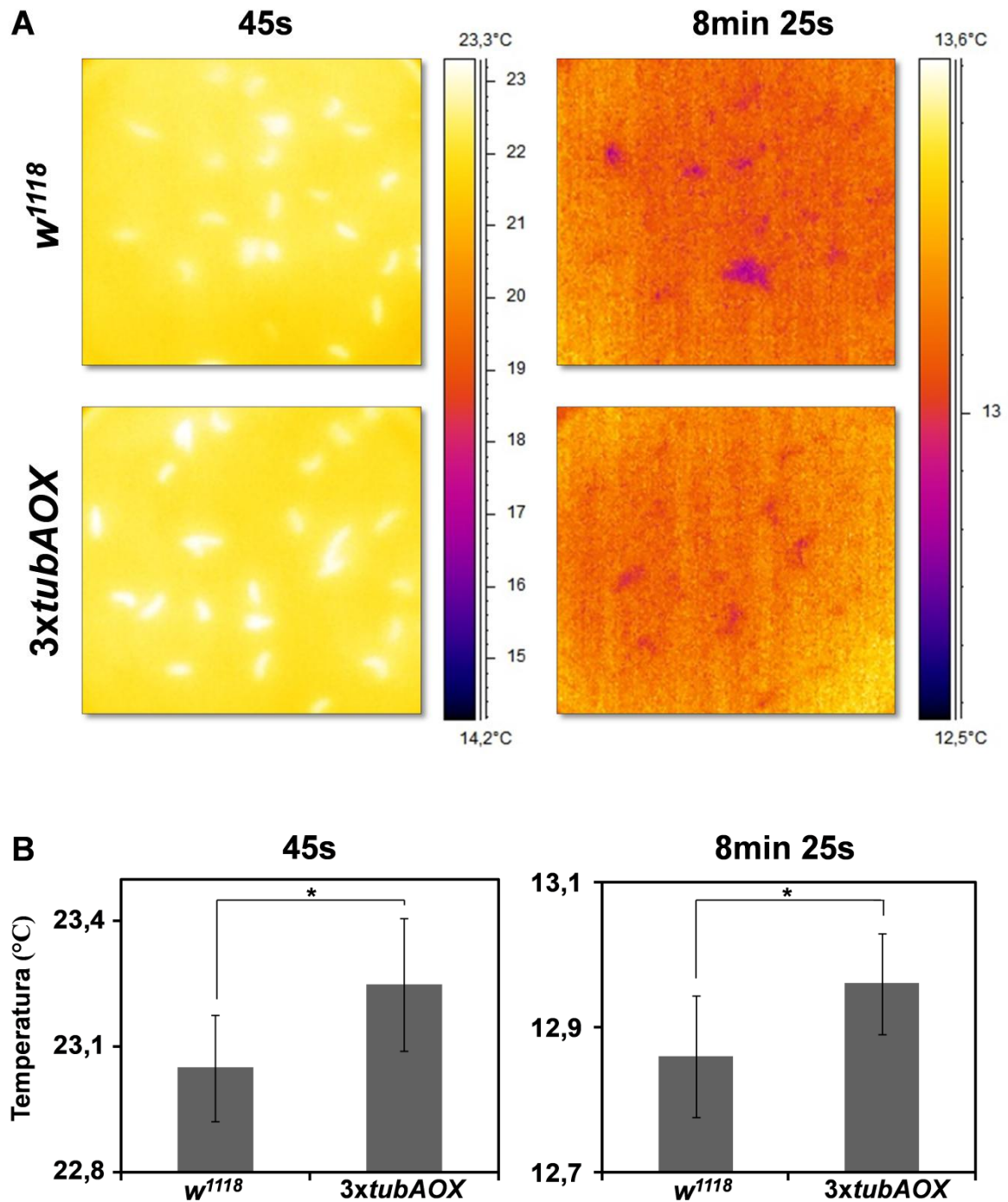


Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 Termografia de infravermelho detecta temperaturas mais elevadas em larvas que expressam AOX

Partindo dos resultados de que a AOX gera efeitos fenotípicos significativos nas drosófilas em baixas temperaturas, principalmente durante o desenvolvimento das larvas, avaliamos por meio da termografia de infravermelho se a temperatura corpórea delas é aumentada pela expressão de AOX. Após estarem aclimatadas a 25°C e então serem submetidas a 12°C, as larvas de drosófilas tendem a perder calor a uma taxa relativamente rápida, chegando aos 12°C em cerca de 9 min (resultados não apresentados). Detectamos uma diferença significativa na temperatura corpórea média das larvas durante este intervalo (Figura 6), tendo aquelas que expressam AOX temperaturas entre 0,1 e 0,2°C mais elevadas do que as controles.

Figura 6. Termografia de infravermelho mostra pequenas diferenças de temperatura entre as larvas de *3xtubAOX* e *w¹¹¹⁸*. (A) Imagens obtidas após as larvas L3 serem submetidas à 12°C por 45 segundos (45s) e 8 minutos e 25 segundos (8min 25s). (B) Temperatura média $\pm$ DP de 10 larvas de cada genótipo, calculada a partir das imagens em A. (*) Diferenças significativas ($P < 0,01$) em comparação com o controle, de acordo com o teste t de *student*.

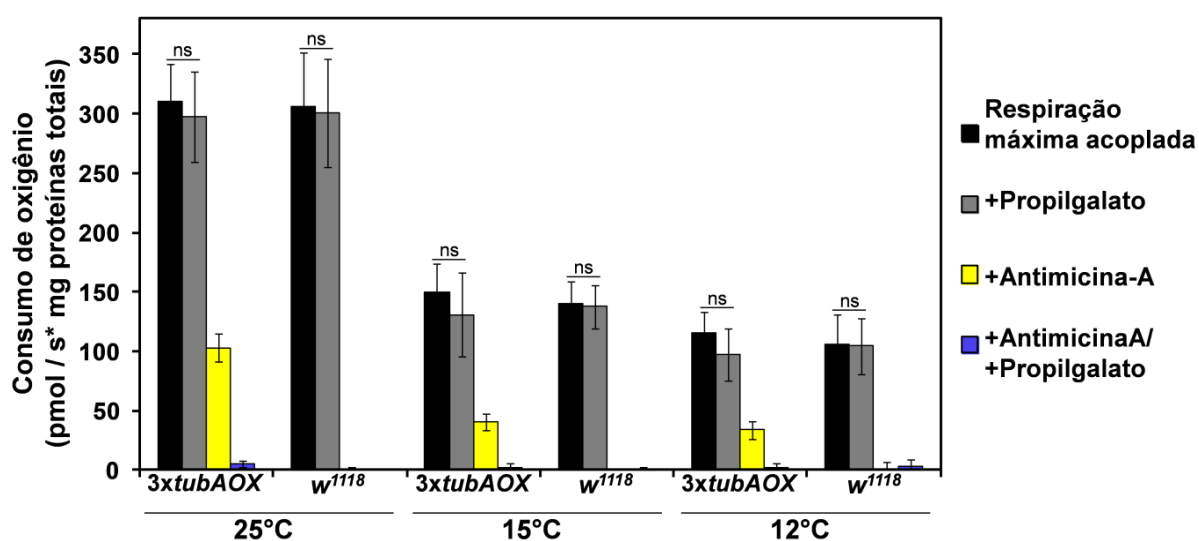


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Parâmetros do funcionamento mitocondrial não são substancialmente afetados em baixas temperaturas devido à expressão de AOX

A termografia de infravermelho em conjunto com os dados fenotípicos indicaram que larvas expressando AOX apresentam temperaturas mais elevadas que a linhagem controle. A próxima etapa então consistiu em verificar se essa enzima tinha uma participação efetiva no consumo de oxigênio mitocondrial e o quanto este poderia ser alterado com a variação térmica. As análises indicaram que a respiração mitocondrial máxima acoplada das larvas não é significativamente afetada pela AOX tanto a 25°C quanto nas temperaturas baixas de 15 e 12°C (Figura 7), e que a adição de propilgalato (inibidor da AOX) não altera o consumo de oxigênio significativamente. Além disso, a proporção de respiração resistente à antimicina A, que inibe o complexo III e permite que todo fluxo de elétrons chegue a AOX, manteve-se semelhante nas temperaturas avaliadas (~33% da respiração máxima acoplada).

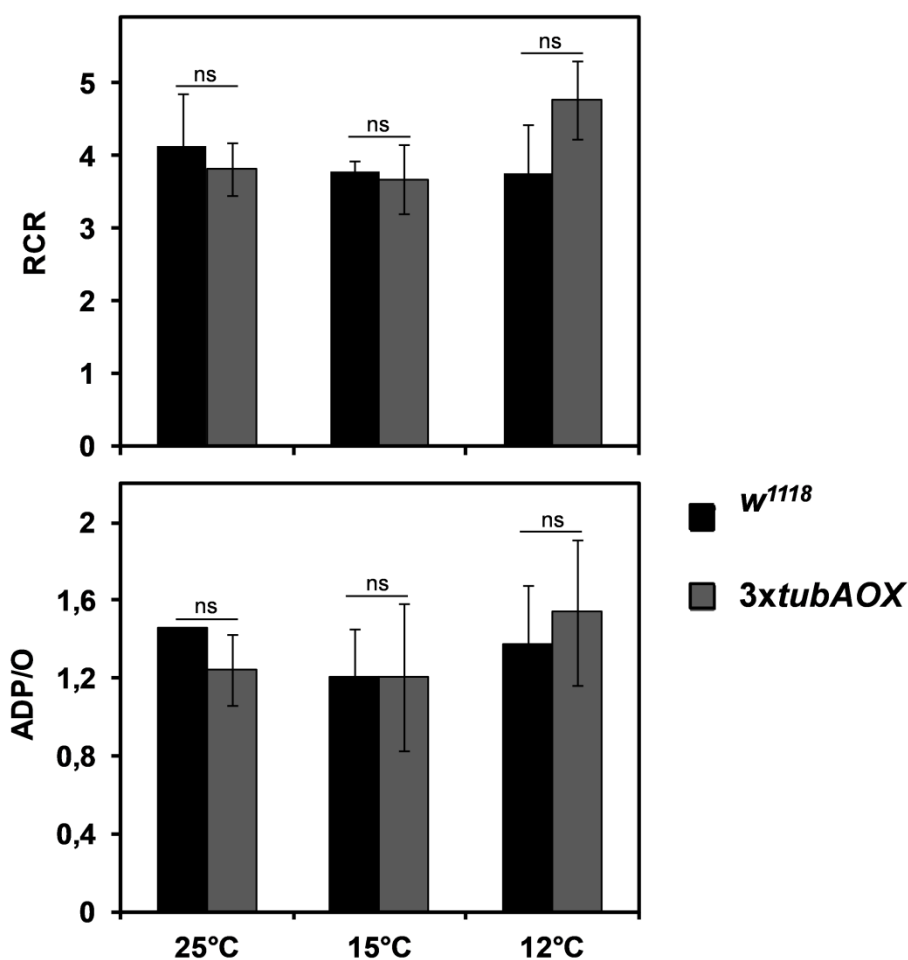
Figura 7. Consumo de oxigênio mitocondrial de homogeneizados de larvas L3 dos genótipos indicados em diferentes temperaturas. A respiração máxima acoplada foi obtida usando piruvato, prolina, malato, glicerol-3-fosfato e ADP. Propilgalato foi usado como inibidor de AOX. Antimicina-A foi usado como inibidor do complexo III. Os dados representam médias $\pm$ DP de 3 repetições biológicas. “ns” indica diferenças não significativas ($P > 0,05$) de acordo com o teste t de *student*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ainda através da respirometria, analisamos se a síntese de ATP poderia ser afetada pela expressão da AOX na CR das drosófilas. Com isso, testamos a hipótese de que o consumo de oxigênio sem bombeamento de prótons pela AOX diminuiria a síntese de ATP, gerando um menor acoplamento entre a fosforilação do ADP e o consumo de oxigênio. Entretanto, ao calcularmos a RCR, que estima o nível de acoplamento (Figura 8A), notamos que este parâmetro não muda na presença de AOX, mesmo nas temperaturas mais baixas. Encontramos resultados muito semelhantes para a razão ADP/O (Figura 8B).

Figura 8. AOX não altera a síntese de ATP mitocondrial de larvas. A taxa de controle respiratório (RCR) (A) e a razão ADP/O (B) de homogeneizados de larvas L3 dos genótipos indicados nas diferentes temperaturas foram calculados assim como descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ DP de pelo menos 3 repetições biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A combinação dos resultados de viabilidade, tempo de desenvolvimento e testes de resistência ao frio das diferentes linhagens de moscas AOX sugere que quando esta enzima é expressa em *D. melanogaster*, ela mitiga efeitos do estresse térmico, principalmente aqueles causados pelo frio. Dentro da faixa de preferência térmica reportada na literatura para *Drosophila*, de 18 a 25°C (DILLON *et al.*, 2009; SOKABE; TOMINAGA, 2009), a viabilidade e o tempo de desenvolvimento se mantiveram praticamente os mesmos entre as linhagens controle e AOX. Porém, as taxas de viabilidade das linhagens AOX foram significativamente maiores a 15 e 12°C, além de seu tempo de desenvolvimento ter sido em torno de 10 e 23% mais acelerado, respectivamente, nas linhagens com maior nível de expressão da enzima.

A temperatura baixa de 12°C é considerada crítica ao desenvolvimento de *D. melanogaster* (SCHOU *et al.*, 2017) e isso nos levou a adotá-la como a mínima utilizada para avaliar o desenvolvimento. Porém, em moscas adultas podemos observar efeitos de temperaturas tão frias quanto 0°, que levam a um fenótipo característico de imobilização completa: o “coma induzido pelo frio” (*chill coma*). Este é gerado principalmente pela incapacidade fisiológica dos insetos de manterem o potencial de repouso muscular (HOSLER; BURNS; ESCH, 2000; MACDONALD *et al.*, 2004). Ao explorarmos o *chill coma* para inferir a resistência ao frio em drosófilas adultas, observamos que todas as linhagens AOX foram mais resistentes ao frio intenso (0°C) e também capazes de se recuperarem mais rapidamente após 1 e 2h expostas a esta temperatura.

É plausível considerarmos que a produção de calor pela ação da AOX gera as vantagens descritas acima em temperaturas frias, pois evidências de termogênese pela AOX em células de animais em cultura já existem. Chrétien *et al.*, (2018) mostraram que células humanas que expressam AOX tratadas com cianeto (inibidor do complexo IV da CR) mantiveram o consumo de oxigênio e a taxa de produção de calor gerada pela respiração significativamente alta, mesmo sem produção de ATP. O pequeno tamanho de insetos como *D. melanogaster* e o fato destes dissiparem calor muito facilmente por resfriamento convectivo (DIGBY, 1955; CHURCH, 1960) resultam em uma temperatura corpórea sempre abaixo da temperatura ambiente, dificultando sua mensuração. Quando nós analisamos imagens termográficas de

larvas L3 a 12°C, detectamos um singelo, mas significativo, aumento na temperatura daquelas que expressam AOX (0,1-0,2°C). Esse achado demonstra que a temperatura corpórea desses organismos está sendo aumentada, quer seja por um mecanismo direto da atividade da AOX, como em algumas plantas (MOORE *et al.*, 2013), ou por outras consequências indiretas geradas em seu metabolismo.

Nós buscamos explicar estes mecanismos através de análises de respirometria, pelas quais hipotetizamos primeiramente encontrar indicativos de que a participação da AOX era maior no consumo de oxigênio às temperaturas mais baixas, o que seria correlacionado com os dados fenotípicos. A 25°C, não encontramos diferenças nos parâmetros respiratórios avaliados, em concordância com as indiferenças obtidas nessa temperatura para as taxas de viabilidade e tempo desenvolvimento. Isso é corroborado por estudos anteriores que mostraram que a AOX não contribui para a respiração quando a CR está totalmente funcional (CHRÉTIEN *et al.*, 2018; DASSA *et al.*, 2009; FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; HAKKAART *et al.*, 2006; SZIBOR *et al.*, 2017;). Entretanto, a 15 e 12°C, o consumo de oxigênio máximo acoplado não decresceu significativamente quando AOX foi inibida, demonstrando que esta não tem uma participação efetiva na respiração fosforilativa mitocondrial quando o segmento do citocromo c da CR está ativo, ao contrário do esperado. Também buscamos indícios de desacoplamento mitocondrial na presença de AOX através da análise da RCR e da razão ADP/O, mas não encontramos. Interessantemente para adultos de *Drosophila simulans*, a RCR e a razão ADP/O são alteradas em função da temperatura, de acordo com o substrato fornecido à respiração. A 12°C, por exemplo, a RCR aumentou em relação a temperaturas mais altas, quando a respiração foi mantida por substratos que suprem o CI com elétrons. Entretanto, a mesma taxa diminuiu quando foi utilizado o G3P (substrato para G3PDH). Ou seja, houve maior condição de desacoplamento quando esta via foi utilizada (PICHAUD *et al.*, 2010). Isso nos demonstra a necessidade de testarmos separadamente as diferentes vias de elétrons que convergem à coenzima-Q, em busca de uma melhor compreensão do funcionamento da AOX na CR.

Além disso, a divergência entre os resultados de PICHAUD *et al.* (2010) e os nossos, pode ser decorrente das análises terem sido feitas, respectivamente, com tecidos de adultos e de larvas, ou com mitocôndrias isoladas e homogeneizados totais. Essa observação pode ser extremamente importante, já que em resposta à

diminuição da capacidade aeróbica devido ao frio, os animais tendem a ter um aumento na densidade mitocondrial, dentre outros “ajustes” (PÖRTNER, 2002).

As larvas de *D. melanogaster* têm um metabolismo em que predomina a glicólise aeróbica, onde a maior parte do ATP é gerada no citoplasma na via glicolítica e as mitocôndrias primariamente geram precursores de vias biossintéticas de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (TENNESSEN *et al.*, 2014; TENNESSEN, *et al.*, 2011). Este é um processo típico de tecidos proliferativos, tais como aquele que ocorre no câncer, conhecido também como efeito Warburg (WARBURG, 1956; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; TENNESSEN, *et al.*, 2014). A respiração mitocondrial exerce uma função essencial, pois através das reações realizadas pela CR, carreadores de elétrons necessários ao funcionamento do ciclo do ácido cítrico são reoxidados, e esta via por sua vez é crucial para que os precursores das vias biossintéticas sejam parcialmente processados. Podemos especular então que o aumento na viabilidade das larvas e a aceleração do tempo de desenvolvimento em baixas temperaturas ocorrem, pois a AOX auxilia nesta reoxidação de carreadores de elétrons, afrouxando limitações impostas ao TCA e ao funcionamento mitocondrial pela redução da temperatura.

Sabe-se que dentre as adaptações fisiológicas de ectotérmicos para manutenção da homeostase celular em ambientes frios, está a alteração na fluidez da membrana mitocondrial (FARKAS *et al.*, 1984; HAZEL *et al.*, 1995). Notavelmente, estudos com *D. melanogaster* já mostraram que as moscas que se recuperavam do *chill coma* mais rapidamente (similarmente aos nossos resultados com 3xtubAOX), após selecionadas por várias gerações, apresentavam grandes quantidades de lipídeos de membrana insaturados (GOTO *et al.* 2010). Já foi visto também que a suplementação da dieta das moscas com ácidos graxos poli-insaturados leva a uma maior resistência ao frio (HOLMBECK; RAND, 2015). Ainda que bastante especulativo, não podemos excluir a possibilidade de AOX estar contribuindo à biossíntese de lipídeos, favorecendo assim a remodelação da membrana mitocondrial e de outras membranas celulares.

Os dados de viabilidade obtidos em temperaturas altas nos reforçam a ideia de que mesmo que todos os efeitos da AOX observados em temperaturas frias estejam envolvidos com produção de calor, há outros mecanismos envolvidos e/ou contornando-os, uma vez que as taxas não foram afetadas negativamente pela presença da enzima. A temperatura de 29°C é considerada acima da faixa de

preferência térmica reportada na literatura para drosófilas, porém não se constitui uma situação tão estressante, já que o metaboloma de *D. melanogaster* analisado por Schou *et al.* (2017) nesta temperatura não apresentou mudanças significativas quando comparadas a 25°C. Dessa forma, a influência de AOX a 29°C poderia não ser tão explícita quanto em temperaturas mais extremas. Realizamos então ensaios a 31°C, que é uma temperatura alta crítica ao desenvolvimento, mas também não encontramos indícios claros de que a expressão da AOX esteja prejudicando as moscas. Contrariamente à hipótese, AOX promoveu vantagens à maioria das linhagens com exceção de 3xtubAOX que apresentou taxas de viabilidade semelhantes ao controle. O tempo de desenvolvimento em altas temperaturas não mostrou alterações entre as linhagens AOX e w^{1118} , o que não indica nada a respeito de termogênese, pois já foi mostrado que acima de 25°C ele é muito pouco acelerado em *D. melanogaster*, mantendo-se muito semelhante à medida que a temperatura é aumentada (SCHOU *et al.*, 2017).

Portanto, não devemos deixar de considerar novas hipóteses sobre os diversos papéis da AOX no metabolismo que beneficiam as linhagens AOX diante de temperaturas extremas baixas e altas. Interessantemente, alterações térmicas propiciam a formação excessiva de ROS (ABELE *et al.*, 1998; ABELE *et al.*, 2002), moléculas que na presença de AOX são reduzidas em abundância (EL-KHOURY *et al.*, 2013; FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; SANZ *et al.*, 2010;). É possível que AOX exerça um papel no estresse oxidativo causado pelos estresses térmicos que avaliamos aqui. Já foi relatado para a mosca-da-fruta oriental *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) que em combate às ROS geradas por temperaturas estressantes, enzimas antioxidantes têm sua atividade aumentada. Entretanto, isso não ocorre diante de exposição prolongada ao frio ou calor, havendo diminuição da atividade dessas enzimas, onde consequentemente a capacidade antioxidante é afetada e o nível de estresse oxidativo é elevado (JIA *et al.* 2011). Levando em conta que os ensaios de desenvolvimento realizados em nosso trabalho são condições de exposição prolongada às temperaturas estressantes, a ideia de que as vantagens conferidas pela AOX são relacionadas à diminuição da produção de ROS pode não ser apenas uma especulação e deverá ser investigada, juntamente com as outras hipóteses levantadas até o presente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observamos que a expressão da AOX em *D. melanogaster* ameniza os efeitos do estresse térmico, principalmente o frio, nas diversas fases de desenvolvimento. Em aspectos gerais, não conseguimos mostrar através da respirometria um mecanismo termogênico o qual pudesse explicar os papéis da AOX refletidos em nossos dados fenotípicos. Assim, enfatizamos a necessidade de estudos mais minuciosos com o auxílio dessa técnica, analisando as vias de transferência de elétrons da CR separadamente, bem como um olhar mais amplo para outros processos metabólicos e estresse oxidativo. Consideramos que o arsenal de papéis benéficos e negativos da AOX em metazoários, já relatados pela literatura pode ser resultante de processos possivelmente não triviais, no entanto a temperatura é um fator a ser atrelado aos estudos com esta enzima, uma vez que mostramos que o organismo responde diferentemente à variação térmica (condição encontrada na natureza).

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H. O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**: parte B: biochemistry & molecular biology, New York, v. 120B, p. 425 -435, June 1998.

ABELE, D.; HEISE, K.; PÖRTNER, H. O.; PUNTARULO, S. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 205, p. 1831-1841, 2002. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/205/13/1831.long>. Acesso em: 10 set. 2018.

ALBERTS, B. *et al.* Conversão de energia: mitocôndrias e cloroplastos. *In*: ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 14, p. 813-878.

ANDJELKOVIĆ, A.; KEMPPAINEN, K. K.; JACOBS, H. T. Ligand-bound geneswitch causes developmental aberrations in *Drosophila* that are alleviated by the alternative oxidase. **G3: genes, genomes, genetics**, Bethesda, v. 6, n.9, p. 2839–2846, Sept. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5015941/>. Acesso em: 20 jan. 2018.

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**, London, v. 5, e 18295, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep18295.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2018.

AON, M. A.; CORTASSA, S.; O'ROURKE, B. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1797, n. 6/7, p. 865-877, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891851/>. Acesso em: 5 nov. 2018.

BAINBRIDGE, P. S.; BOWNES, M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Embriology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 66, p. 57-80, 1981.

BIANCO, A. C. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 281-289, ago. 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302000000400003. Acesso em: 10 jun. 2017.

BORECKÝ, J.; VERCESI, A. E. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. **Bioscience Reports**, London, v. 25, p. 271–286, June 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10540-005-2889-2>. Acesso em: 30 jun. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, n. 72, p. 248-245, 1976.

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**, London, v. 42, n. 6, p. 664-669, Feb. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbin.10943>. Acesso em: 9 out. 2018.

CAMPOS-ORTEGA, J. A.; HARTENSTEIN, V. **The embryonic development of *Drosophila melanogaster***. Berlin: Springer-Verlag, 1985.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 84 n. 1, p. 277-359, Jan. 2004. Disponível em: <http://physrev.physiology.org/content/84/1/277.long>. Acesso em: 10 jun. 2017.

CHIANG, C. H. Tactic reactions of young adults of *Drosophila melanogaster*. **American Midland Naturalist**, Notre Dame, v. 70, n. 2, p. 329–333, Oct. 1963.

CHRÉTIEN, D. *et al.* Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 16, n. 2003992, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003992>. Acesso em: 5 nov. 2018.

CHURCH, N. S. Heat loss and the body temperatures of flying insects. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 37, p. 186-212, 1960. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/37/1/171>. Acesso em: 20 ago. 2018.

COLINET, H.; RENAULT, D. Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. **Biology Letters**, London, v. 8, n. 6, p. 1050-1054, Dec. 2012. Disponível em: <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/8/6/1050>. Acesso em: 30 jun. 2017.

DAHAL, K.; MARTYN, G. D.; ALBER, N. A.; VANLERBERGHE, G. C. Coordinated regulation of photosynthetic and respiratory components is necessary to maintain chloroplast energy balance in varied growth conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 3, 657-671, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/68/3/657/2736384>. Acesso em: 9 nov. 2018.

DA-RÉ, C., *et al.* UCP4C mediates uncoupled respiration in larvae of *Drosophila melanogaster*. **EMBO Reports**, Chichester v. 15, n. 5, p. 586-591, Mar. 2014. Disponível em: <http://embor.embopress.org/content/15/5/586.long>. Acesso em: 30 jun. 2017.

DASSA, E. P. *et al.* Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 1, n. 30, p. 33-36, Apr. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378104/>. Acesso em: 30 jun. 2017.

DIGBY, P. S. B. Factors affecting the temperature excess of insects in sunshine. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 32, p. 279-298, 1955. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/32/2/279>. Acesso em: 20 ago. 2018.

DILLON, M. E.; WANG, G.; GARRITY, P. A.; HUEY, R. B. *et al.* Thermal preference in *Drosophila*. **Journal of Thermal Biology**, Kidlington, v. 34, n. 3, p. 109–119, Apr. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714919/>. Acesso em: 23 jun. 2017.

DUFFY, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. **Genesis**, Washington, v. 34, p. 1-15, 2002.

DUNNILL, C.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **Internacional Wound Journal**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 89-96, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iwj.12557>. Acesso em: 10 nov., 2018.

EL-HATTAB, A. W.; SULEIMAN, J.; ALMANNAIC, M.; SCAGLIA, F. Mitochondrial dynamics: biological roles, molecular machinery, and related diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, Waltham, v. 125, n. 4, p. 315-321, Dec. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>. Acesso em: 5 jan. 2019.

EL-KHOURY, R. *et al.* Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, Jan. 2013. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003182>. Acesso em: 12 jun. 2017.

FARKAS, T. Adaptation of fatty acid composition to temperature – a study on carp (*Cyprinus carpio* L.) liver slices. **Comparative Biochemistry and Physiology**: parte B: biochemistry & molecular biology, New York, v. 79, p. 531–535, 1984.

FARMER, C. G. A lizard that generates heat. **Nature**, London, v. 259, p. 470-471, Jan. 2016.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 61, p. 243-282, 1999. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.61.1.243?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=physiol. Acesso em: 11 nov. 2018.

FERNANDEZ-AYALA, D. J. *et al.* Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 449–460, May 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413109000643?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jun. 2017.

FERNANDEZ-MORENO, M. A.; FARR, C.L.; KAGUNI, L.S.; GARESSE. *Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 372, p. 33-49, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876951/>. Acesso em: 25 jun. 2017.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Science**, Oxford, v. 25, p. 319–324, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1). Acesso em: 20 abr.-2018.

GERHART-HINES, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 26, n. 7, p. 1913 -1923, Apr. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1847661/>. Acesso em: 12 dez. 2018.

GOTO, S. G.; UDAKA, H.; UEDA, C.; KATAGIRI, C. Fatty acids of membrane phospho- lipids in *Drosophila melanogaster* lines showing rapid and slow recovery from chill coma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 391, n. 2, p.1251–1254, 2010.

GRANDEMANGE, S.; HERZIG, S.; MARTINOU J. C. Dinâmica mitocondrial e câncer. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 19, n. 1, p. 50-56, Feb. 2009.

GUDERLEY H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 79, p. 409–427, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1017/S1464793103006328?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 4 jan. 2019.

HACKENBROCK, C. R. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 61, p. 598–605, 1968.

HAKKAART, G. A.; DASSA, E.P.; JACOBS, H.T.; RUSTIN, P. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. **EMBO Reports**, Chichester, v. 7, n. 3, p. 341-345, Dec. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456879/>. Acesso em: 5 maio 2017.

HANAK, P.; JEZEK P. Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis: UCP4 as the ancestral uncoupling protein. **FEBS Letters**, Chichester, v. 495, n. 3, p. 137 – 141, Apr. 2001. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793\(01\)023389/abstract;jsessionid=7C4C179675613032A7FB90A00EDB2542.f03t01](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793(01)023389/abstract;jsessionid=7C4C179675613032A7FB90A00EDB2542.f03t01). Acesso em: 30 jun. 2017.

HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 57, p. 19–42, 1995.

HEINRICH, B. Beating the heat in obligate insect endotherms: the environmental problem and the organismal solutions. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 29, p. 1157-1168, 1989.

HEINRICH, B. Insect thermoregulation. **Endeavour**, London, v. 19, n. 1, p. 28–33, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(95\)98891-I](https://doi.org/10.1016/0160-9327(95)98891-I). Acesso em: 12 out.-2018.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HOLMBECK, M. A.; RAND, D. M. Dietary fatty acids and temperature modulate mitochondrial function and longevity in *Drosophila*. **Journals of Gerontology: series A: biological sciences and medical sciences**, Washington, v. 70, n. 11, p. 1343-1354, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4612386/>. Acesso em: 8 nov. 2018.

HOSLER, J. S.; BURNS, J. E.; ESCH, H. E. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill coma. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 46, p. 621–627, May-2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191099001481?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jun. 2017.

HUANG, S. *et al.* The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 171, n. 3, p. 1551–1559, July 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4936549/>. Acesso em: 8 nov. 2018.

JASTROCH, M. *et al.* Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays in Biochemistry**, London, v. 47, p. 53–67, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bse0470053>. Acesso em: 10 jan. 2019.

JIA, F.; DOU, W.; HU, F.; WANG, J. Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 956-963, Dec. 2011.

JUSZCZUK, I. M.; RYCHTER, A. M. Alternative oxidase in higher plants. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 50, n. 4, p. 1257–1271, Nov. 2003. Disponível em: http://www.actabp.pl/pdf/4_2003/1257.pdf. Acesso em: 30 jun. 2017.

KEMPPAINEN, K. K.; KEMPPAINEN, E.; JACOBS, H.T. The alternative oxidase AOX does not rescue the phenotype of tko25t mutant flies. **G3: genes, genomes, genetics**, Bethesda, v. 4, n. 10, p. 2013-2021, Aug. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199707/>. Acesso em: 5 jan. 2019.

KEMPPAINEN, K. K. *et al.* Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 2078-2093, Apr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959817/>. Acesso em: 30 jun. 2017.

KNUTSON, R. M. Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. **Science**, Washington, v. 186, n. 4165, p. 746–747, 1974.

KOHSIMA, S. A novel cold-tolerant insect found in a himalayan glacier. **Nature**, London, v. 310, n. 5974, p. 225–227, July 1984.

KRAUSS, S.; ZHANG, C. Y.; LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 271–286, Mar. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738989>. Acesso em: 13 jun. 2017.

LALOI, M. *et al.* A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, London, v. 389, p. 135 – 136, Sept. 1997. Disponível em: <https://www.nature.com/nature/journal/v389/n6647/full/389135a0.html>. Acesso em: 30 jun. 2017.

LAROSA, V.; REMACLE, C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. **Bioscience Reports**, London, v. 38, n. 5, p. BSR20171492, Oct. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6167499/>. Acesso em: 10 nov. 2018.

LIN, J. D. The PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. **Molecular Endocrinology**, Washington, v. 23, p. 2 -10, Jan. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646599/>. Acesso em: 20 abr. 2018.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 1, n. 6, p. 361-370, June 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>. Acesso em: 10 abr. 2018.

MACDONALD, S. S.; RAKO, L.; BATTERHAM, P.; HOFFMANN, A. A. Dissecting chill coma recovery as a measure of cold resistance: evidence for a biphasic response in *Drosophila melanogaster* **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 50, n. 8, p. 695-700, Aug. 2004.

MASSON, S. W. C. *et al.* Mitochondrial glycerol 3-phosphate facilitates bumblebee pre-flight thermogenesis. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 13107, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13454-5>. Acesso em: 8 nov. 2018.

MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C. Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. **IUBMB Life**, Chichester, v. 56, p. 333-341, June 2004. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/1521-6540400000876/epdf>. Acesso em: 30 jun. 2017.

MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C.; STAPLES, J. F. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 212, p. 2627-2634, Aug. 2009. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/212/16/2627.long>. Acesso em: 30 jun. 2017.

MEEUSE, B. J. D. Thermogenic respiration in Aroids. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 26, p. 117-126, 1975.

MEIS, L. Role of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase on heat production and thermogenesis. **Bioscience Reports**, London, v. 21, n. 2, p. 113-137, Apr. 2001. Disponível em: <http://www.bioscirep.org/content/21/2/113.long>. Acesso em: 30 jun. 2017.

MERKEY, A. B.; Wong C.K.; Hoshizaki, D.K.; Gibbs, A.G. Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 57, p. 1437–1445, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191011002162?via%3Dihub>. Acesso em 7 jan. 2019.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, London, v. 191, p. 144–148, 1961.

MOORE, A. L. *et al.* Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. . **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 64, p. 637-663, 2013.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. **Experimental Physiology**, London, v. 93, p. 773 -79, July, 2008.

MORTON, J. D.; BARNES, M. F.; ZYSKOWSKI, R. F. Respiratory control ratio: a computer simulation of oxidative phosphorylation. **Biochemical Education**, Elmsford, v. 24, n. 2, p. 110-111, 1996.

MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Princípios de fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. A thermosensory pathway that controls body temperature. **Nature Neuroscience**, New York, v. 11, n. 1, p. 62–71, 2008. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/nn2027>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. *In*: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 19, p. 731-797.

PALADE, G. E. The fine structure of mitochondria. **The Anatomical Record**, Philadelphia, v. 114, n. 3, p.427-451, Nov. 1952.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. . **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 437-496, 1993. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ge.27.120193.002253>. Acesso em: 5 dez. 2018

PERILLO, B. *et al.* Nuclear receptor-induced transcription is driven by spatially and timely restricted waves of ROS: the role of Akt, IKK α , and DNA damage repair enzymes. **Nucleus**, London, v. 5, n 5, p. 482-491, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4164490/>. Acesso em: 10 nov. 2018.

PFANNER, N. *et al.* Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 204, n. 7, p. 1083–1086, Mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.201401006>. Acesso em: 4 jan. 2019.

PICHAUD, N. *et al.* Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 213, n. 10, p. 1665-1675, 2010. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/213/10/1665>. Acesso em: 6 jan. 2019.

PIMENTEL, E. R. Mitocôndria. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 3. ed. Barueri: Manole, 2013. cap.15, p. 369-385.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**: parte B: biochemistry & molecular biology, New York, v.132A, n. 4 p. 739-761, 2002.

PUIGSERVER, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 6, p. 829 -839, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5). Acesso em: 20 out. 2018.

QUINN, P. J. Effects of temperature on cell membranes. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 42, p. 237-258, Feb. 1988. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/20078144_Effects_of_temperature_on_cell_membranes. Acesso em: 10 jan. 2019.

RAMSDEN, D. B. *et al.* Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Brain and Behavior**, Chichester, v. 2, n. 4, p. 468–478, July 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432969/>. Acesso em: 13 jun. 2017.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Eckert fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2000.

RASMUSSEN, A. G.; SOOLE, K. L.; ELTHON, T. E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 23–39, June 2004. Disponível em: http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141720?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=arplant. Acesso em 20 abr. 2018.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; ISUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation signaling. **Cell Signalling**, Philadelphia, v. 24, n. 5, p. 981-990, May 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454471/>. Acesso em: 10 nov. 2010.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochemical Journal**, London, v. 345, n. 2, p. 161 – 179, Jan. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220743/>. Acesso em: 13 jun. 2017.

RODRIGUES, A. P. C. *et al.* Developmental arrest in *Drosophila melanogaster* caused by mitochondrial DNA replication defects cannot be rescued by the alternative oxidase. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 10882, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29150-x>. Acesso em: 2 dez. 2018.

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

SAARI, S. *et al.* Alternative respiratory chain enzymes: therapeutic potential and possible pitfalls. **Biochimica et Biophysica Acta**: - molecular basis of disease, Amsterdam, 2018. In press. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443918303892>. Acesso em: 4 jan. 2019.

SAARI, S. *et al.* Expression of *Ciona intestinalis* AOX causes male reproductive defects in *Drosophila melanogaster*. **BMC Developmental Biology**, London, v. 17, n. 9, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5496232/>. Acesso em: 12 abr. 2018.

SANZ, A.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; STEFANATOS, R. K.; JACOBS, H. T. Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in *Drosophila*. **Aging**, Albany, v. 2, n. 4, p. 200-223, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880708/>. Acesso em: 4 out. 2018.

SCHECKHUBER, C. Q. *et al.* Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. **Nature Cell Biology**, London, v. 9, p. 99-105, 2007.

SCHOU, M. F. *et al.* Metabolic and functional characterization of effects of developmental temperature in *Drosophila melanogaster*. **American Journal of Physiology**: regulatory, integrative and comparative physiology, Bethesda, v. 312, n. 2, p. 211-222, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5336569/>. Acesso em: 12 jun. 2017.

SEEBACHER, F. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: what is the role of phenotypic flexibility? **Journal of Comparative Physiology: B: biochemical, systematic and environmental physiology**, New York, v. 175, p. 453-461, 2005.

SEEBACHER, F. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 212, n. 18, p. 2885–2891, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.024430>. Acesso em: 5 nov. 2018.

SEYMOUR, R. S. Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. **Bioscience Reports**, London, v. 21, n. 2, p. 223–236, Apr. 2001. Disponível em: <http://www.bioscirep.org/content/21/2/223.long>. Acesso em: 12 jun. 2017.

SHEN, H. M.; PERVAIZ, S. Reactive oxygen species in cell fate decisions. *In*: SHEN, H. M.; PERVAIZ, S. **Essentials of apoptosis**. Berlin: Hum. Press: Springer, 2009. p. 199–221.

SHIBA, T. *et al.* Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 12, p. 4580–4585, Mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1218386110>. Acesso em: 25 jan. 2019.

SLIP, D. J.; SHINE, R. Reptilian endothermy: a field study of thermoregulation by brooding diamond pythons. **Journal of Zoology**, Chichester, v. 216, p. 367–378, Oct. 1988. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14697998.1988.tb02435.x/abstract>. Acesso em: 13 jun. 2017.

SLOCINSKA, M. *et al.* Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the cockroach *Gromphadorhina cocquerelliana*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Heidelberg, v. 43, n. 3, p. 717– 727, Dec. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10863-011-9385-0>. Acesso em: 30 jun. 2017.

SLOCINSKA, M. *et al.* Molecular identification and functional characterisation of uncoupling protein 4 in larva and pupa fat body mitochondria from the beetle *Zophobas atratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Philadelphia, v. 162, n. 4, p.126-133, Apr. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495912000450>. Acesso em: 30 jun. 2017.

SOKABE, T.; TOMINAGA, M. A temperature-sensitive TRP ion channel, Painless, functions as a noxious heat sensor in fruit flies. **Communicative & Integrative Biology**, New York, v. 2, n. 2, p. 170-173, Mar. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686375/>. Acesso em: 30 jun. 2017.

SORENSEN, J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology Letters**, Montpellier, v. 6, p. 1025– 1037, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>. Acesso em 15 abr. 2018.

STABENTHEINER, A.; KOVAC, H.; BRODSCHNEIDER, R. Honeybee Colony Thermoregulation – Regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal Stress, **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, e8967, Jan. 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008967>. Acesso em 15 abr. 2018.

ST-PIERRE, J.; CHAREST, P.; GUDERLEY H. Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 201, p. 2961 -2970, 1998.

SUKHORUKOV, V. M. *et al.* Emergence of the mitochondrial reticulum from fission and fusion dynamics. **PLoS Computational Biology**, Cambridge, v. 10, n. 8, e1002745, Oct. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486901/>. Acesso em: 9 jan. 2019.

SZIBOR, M. *et al.* Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **Disease Models & Mechanisms**, Cambridge, v. 10, n. 2, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312010/>. Acesso em: 20 jun. 2017.

TATTERSALL, G. J. *et al.* Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. **Science Advances**, Washington, v. 2, n. 1, e1500951, Jan. 2016. Disponível em: <http://advances.sciencemag.org/content/2/1/e1500951/tab-pdf>. Acesso em: 10 jun. 2017.

TENNESSEN, J. M. *et al.* Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. **G3: genes, genomes, genetics**, Bethesda, v. 13, n. 2, p.139-148, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025483/>. Acesso em: 5 nov. 2018.

TENNESSEN, J. M. *et al.* The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 139-148, Feb. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072597/>. Acesso em: 10 jan. 2019.

TRACHOOTHAM, D. *et al.* Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v. 10, n. 1343–74, Aug. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932530/>. Acesso em: 20 out. 2018.

TYLER, M. S. Development of the Fruit Fly. In: TYLER, M. S. **Developmental Biology: A guide for experimental biology**. 2 ed., Sunderland: Sinauer, 2000. cap. 8, p. 85-101.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, Washington, v. 324, n. 5930, p.1029-1033, May 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

WAGNER, A. M. *et al.* Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1777, p. 993–1000, July 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272808000881?via%3Dihub>. Acesso em: 15 maio 2017.

WANG, H.; SIEMENS, J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature**, London, v. 2, n. 2, p. 178–187, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1040604>. Acesso em: 10 jan. 2019.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, Washington, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956. WATLING, J. R.; ROBINSON S. A.; SEYMOUR R. S. Contribution of the alternative pathway to respiration during thermogenesis in flowers of the sacred lotus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 4, p. 1367-1373, Apr. 2006. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/140/4/1367.long>. Acesso em: 30 jun. 2017.

WERNER, S.; NEUPERT, W. Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat-liver mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 25, p. 379-396, 1972.

APÊNDICE A: Taxas de viabilidade dos ovos/larvas e classes estatísticas

Tabela A.1. Valores de viabilidade dos ovos/larvas (OV) calculados como a proporção de ovos desenvolvidos em pupas nas temperaturas indicadas.

Média OV $\pm$ DP (classe estatística*)						
Genótipo	12°C	15°C	18°C	25°C	29°C	31°C
<i>w¹¹¹⁸</i>	0,26 $\pm$ 0,05 (a)	0,44 $\pm$ 0,11 (a)	0,69 $\pm$ 0,11 (a,b)	0,61 $\pm$ 0,20 (a)	0,41 $\pm$ 0,08 (a)	0,42 $\pm$ 0,11 (a)
<i>tubAOX³⁵</i>	0,44 $\pm$ 0,11 (a,b)	0,50 $\pm$ 0,22 (a,b)	0,61 $\pm$ 0,22 (a,b)	0,71 $\pm$ 0,16 (a)	0,59 $\pm$ 0,17 (b)	0,67 $\pm$ 0,12 (b)
<i>tubAOX¹¹²</i>	0,40 $\pm$ 0,13 (a,b)	0,48 $\pm$ 0,13 (a,b)	0,59 $\pm$ 0,13 (a)	0,65 $\pm$ 0,19 (a)	0,53 $\pm$ 0,13 (a,b)	0,45 $\pm$ 0,12 (a)
<i>tubAOX⁷</i>	0,40 $\pm$ 0,20 (a,b)	0,56 $\pm$ 0,10 (a,b)	0,81 $\pm$ 0,10 (b)	0,71 $\pm$ 0,20 (a)	0,73 $\pm$ 0,16 (b,c)	0,65 $\pm$ 0,08 (b)
<i>2XtubAOX</i>	0,54 $\pm$ 0,16 (b)	0,67 $\pm$ 0,09 (b)	0,71 $\pm$ 0,08 (a,b)	0,67 $\pm$ 0,20 (a)	0,57 $\pm$ 0,13 (a,b,c)	0,62 $\pm$ 0,12 (b)
<i>3XtubAOX</i>	0,55 $\pm$ 0,14 (b)	0,65 $\pm$ 0,11 (b)	0,76 $\pm$ 0,11 (a,b)	0,73 $\pm$ 0,14 (a)	0,67 $\pm$ 0,12 (b,c)	0,39 $\pm$ 0,11 (a)

* $p < 0.05$, de acordo com ANOVA simples, seguido do teste *a posteriori* de Tukey, calculado para cada temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B: Taxas de viabilidade pupal e classes estatísticas

Tabela B.1. Valores de viabilidade pupal (PV) calculados como a proporção de pupas desenvolvidas em adultos nas temperaturas indicadas.

Média PV $\pm$ DP (classe estatística*)						
Genótipo	12°C	15°C	18°C	25°C	29°C	31°C
<i>w¹¹¹⁸</i>	0,00	0,69 $\pm$ 0,12 (a)	0,93 $\pm$ 0,05 (a,b)	0,94 $\pm$ 0,06 (a)	0,82 $\pm$ 0,09 (a)	0,00
<i>tubAOX³⁵</i>	0,00	0,66 $\pm$ 0,11 (a)	0,92 $\pm$ 0,09 (a)	0,96 $\pm$ 0,04 (a)	0,78 $\pm$ 0,12 (a)	0,00
<i>tubAOX¹¹²</i>	0,00	0,74 $\pm$ 0,13 (a)	0,92 $\pm$ 0,07 (a)	0,95 $\pm$ 0,08 (a)	0,82 $\pm$ 0,11 (a)	0,00
<i>tubAOX⁷</i>	0,00	0,68 $\pm$ 0,09 (a)	0,93 $\pm$ 0,06 (a,b)	0,97 $\pm$ 0,04 (a)	0,87 $\pm$ 0,08 (a)	0,00
<i>2XtubAOX</i>	0,00	0,93 $\pm$ 0,09 (b)	0,99 $\pm$ 0,02 (b)	0,96 $\pm$ 0,05 (a)	0,86 $\pm$ 0,14 (a)	0,00
<i>3XtubAOX</i>	0,00	0,82 $\pm$ 0,07 (a,b)	0,90 $\pm$ 0,06 (a)	0,95 $\pm$ 0,03 (a)	0,87 $\pm$ 0,09 (a)	0,00

* $p < 0.05$, de acordo com ANOVA simples, seguido do teste *a posteriori* de Tukey, calculado para cada temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE C: Tempo de desenvolvimento das pupas e classes estatísticas

Tabela C.1. Valores de tempo desenvolvimento de ovos até pupas (TDP) calculados como a média do tempo em dias.

Média TDP $\pm$ DP (classe estatística*)						
Genótipo	12°C	15°C	18°C	25°C	29°C	31°C
<i>w¹¹¹⁸</i>	42,23 $\pm$ 7,85 (a)	19,87 $\pm$ 2,73 (a)	12,05 $\pm$ 1,38 (a)	6,66 $\pm$ 0,80 (a)	6,07 $\pm$ 0,76 (a)	6,53 $\pm$ 0,80
<i>tubAOX³⁵</i>	38,036 $\pm$ 9,17 (b)	19,29 $\pm$ 3,06 (a,b)	12,31 $\pm$ 1,82 (b)	6,32 $\pm$ 0,76 (b)	5,63 $\pm$ 0,64 (b)	6,22 $\pm$ 0,65
<i>tubAOX¹¹²</i>	38,34 $\pm$ 7,57 (b)	19,29 $\pm$ 3,20 (a,b)	12,68 $\pm$ 1,96 (c)	6,46 $\pm$ 0,85 (c)	5,80 $\pm$ 0,62 (c)	6,82 $\pm$ 0,89
<i>tubAOX⁷</i>	36,53 $\pm$ 7,79 (b,c)	18,83 $\pm$ 3,00 (b)	12,14 $\pm$ 1,75 (a,b)	6,63 $\pm$ 0,96 (a)	6,02 $\pm$ 0,66 (a)	6,52 $\pm$ 0,80
<i>2XtubAOX</i>	34,95 $\pm$ 7,50 (c)	17,80 $\pm$ 2,74 (c)	11,92 $\pm$ 1,86 (a)	6,56 $\pm$ 0,83 (a,c)	5,43 $\pm$ 0,60 (d)	6,08 $\pm$ 0,80
<i>3XtubAOX</i>	32,08 $\pm$ 8,25 (d)	17,59 $\pm$ 2,68 (c)	11,65 $\pm$ 2,26 (d)	6,47 $\pm$ 0,94 (c)	5,91 $\pm$ 0,66 (a,c)	6,94 $\pm$ 1,04

* p < 0.05, de acordo com ANOVA simples, seguido do teste *a posteriori* de Tukey, calculado para cada temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE D: Tempo de desenvolvimento dos adultos e classes estatísticas

Tabela D.1. Valores de tempo de desenvolvimento de ovos até adultos (TDA) calculados como a média do tempo em dias.

Média TDA $\pm$ DP (classe estatística*)						
Genótipo	12°C	15°C	18°C	25°C	29°C	31°C
<i>w¹¹¹⁸</i>	0,00	32.15 $\pm$ 2.55 (a)	20.31 $\pm$ 1.28 (a)	10.42 $\pm$ 0.77 (a)	9.37 $\pm$ 0.62 (a)	0,00
<i>tubAOX³⁵</i>	0,00	31.05 $\pm$ 3.30 (b,c)	20.79 $\pm$ 1.97 (b)	10.35 $\pm$ 0.69 (a)	9.01 $\pm$ 0,36 (b)	0,00
<i>tubAOX¹¹²</i>	0,00	30.54 $\pm$ 3.23 (b,c)	21.30 $\pm$ 2.11 (c)	10,60 $\pm$ 0.87 (b)	9.14 $\pm$ 0.57 (c,e)	0,00
<i>tubAOX⁷</i>	0,00	31.28 $\pm$ 3.20 (c)	20.78 $\pm$ 1.94 (b)	10.73 $\pm$ 0.92 (b)	9.32 $\pm$ 0.37 (a,d)	0,00
<i>2XtubAOX</i>	0,00	29.61 $\pm$ 3.01 (d)	20.29 $\pm$ 2.09 (a)	10.39 $\pm$ 0.72 (a,c)	9.03 $\pm$ 0.19 (b,c)	0,00
<i>3XtubAOX</i>	0,00	30.45 $\pm$ 2.42 (b)	19.98 $\pm$ 2.92 (d)	10.46 $\pm$ 0.95 (a,c)	9.23 $\pm$ 0.64 (d,e)	0,00

* p < 0.05, de acordo com ANOVA simples, seguido do teste *a posteriori* de Tukey, calculado para cada temperatura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 28/02/2019



Assinatura do autor