

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 5/03/2026.



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

Murilo Ferreira Othonicar

**Adaptações na composição do sistema de transporte de elétrons
mitocondrial em larvas de *Drosophila melanogaster* em resposta a
restrição nutricional e a expressão da oxidase alternativa**

São José do Rio Preto
2024

Murilo Ferreira Othonicar

**Adaptações na composição do sistema de transporte de elétrons
mitocondrial em larvas de *Drosophila melanogaster* em resposta a
restrição nutricional e a expressão da oxidase alternativa**

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 – Processo: 22/01509-3
CAPES – Código: 001

Orientador: Prof^a. Dr^o Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto
2024

O87a Othonicar, Murilo Ferreira

Adaptações na composição do sistema de transporte de elétrons mitocondrial em larvas de *Drosophila melanogaster* em resposta a restrição nutricional e a expressão da oxidase alternativa. / Murilo Ferreira Othonicar. -- São José do Rio Preto, 2024

75 p. : il., tabs.

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

Orientador: Marcos Túlio de Oliveira

1. Mitocôndria. 2. Oxidase alternativa. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. Sistema de transporte de elétrons. 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.



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

Murilo Ferreira Othonicar

**Adaptações na composição do sistema de transporte de elétrons
mitocondrial em larvas de *Drosophila melanogaster* em resposta a
restrição nutricional e a expressão da oxidase alternativa.**

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 – Processo: 22/01509-3
CAPES – Código: 001

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
UNESP – Jaboticabal - SP
Orientador

Prof. Dr^ª. Larissa Dias da Cunha
USP – Ribeirão Preto - SP

Prof. Dr. Guilherme Oliveira Barbosa
UNICAMP – Campinas - SP

São José do Rio Preto
5 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço,

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 22/01509-3, associado ao processo 21/06711-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço à Boehringer Ingelheim Fonds pela concessão do *Travel Grant* que me permitiu estagiar por 3 meses, no laboratório do professor do Dr. Mike Gerards na Universidade de Maastricht nos Países Baixos.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcos Túlio de Oliveira e toda a equipe do Laboratório de Biologia Mitocondrial – FCAV/UNESP

Ao Professor Dr. Mike Gerards e sua equipe.

E a minha família.

RESUMO

A oxidase alternativa mitocondrial (AOX) é naturalmente ausente em vertebrados e insetos, mas presente em tunicados como *Ciona intestinalis*. A expressão xenotópica de AOX de *C. intestinalis* em *Drosophila melanogaster* e camundongos tem mostrado resultados promissores no combate a disfunções mitocondriais, exibindo potencial para um futuro uso terapêutico. A AOX é uma enzima que pode contornar os complexos III e IV do sistema de transporte de elétrons mitocondrial (ETS), fornecendo um caminho adicional para a redução de oxigênio e a reoxidação da coenzima Q (CoQ), permitindo a continuação do fluxo metabólico em situações de disfunções da ETS. No entanto, em moscas que expressam AOX, há evidências sugerindo que essa enzima não consegue acessar à CoQ reduzida pelo complexo I, mas consegue acessar prontamente CoQ reduzidas pela glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mGPDH). A hipótese é que isso ocorra pelo fato do complexo I estar frequentemente formando supercomplexos (SCs) com os complexos III e IV, o que supostamente sequestra moléculas de CoQ, proporcionando condições que permitem que AOX se interaja funcionalmente e preferencialmente com enzimas fora de SCs, como mGPDH. No Capítulo 1 dessa dissertação, utilizamos linhagens transgênicas de *D. melanogaster* para modular os níveis de expressão de *Gpo1*, gene que codifica a isoforma ubíqua de mGPDH, e avaliamos um fenótipo característico de moscas AOX, que é a letalidade pupal induzida por limitação nutricional. Apesar de termos observado um resgate dessa letalidade quando *Gpo1* foi superexpressa, notamos que várias das linhagens usadas não apresentaram as características genético-moleculares necessárias para termos confiança nos dados. No Capítulo 2, buscamos verificar como a ETS de *Drosophila* está organizado na presença e ausência de AOX e em condições nutricionais distintas, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida azul nativa (BN-PAGE). Observamos mudanças no padrão de distribuição e nos níveis dos complexos mitocondriais: 1) larvas apresentam maior abundância de complexos de maior peso molecular e SCs do que indivíduos adultos; 2) a presença de AOX aumenta uma das formas mais comuns de SC em larvas; e 3) a restrição nutricional promove aumento dos níveis dos complexos mitocondriais e SCs, independentemente da expressão de AOX em larvas. Nossos resultados indicam que o contexto molecular da membrana interna mitocondrial influencia a atividade de AOX.

Palavras-chave: Mitocôndria. Oxidase alternativa. *Drosophila melanogaster*.
Sistema de transporte de elétrons

ABSTRACT

Mitochondrial alternative oxidase (AOX) is naturally absent in vertebrates and insects, but present in tunicates such as *Ciona intestinalis*. The xenotopic expression of AOX from *C. intestinalis* in *Drosophila melanogaster* and mice has shown promising results in combating mitochondrial dysfunction, showing potential for future therapeutic use. AOX is an enzyme that can bypass complexes III and IV of the mitochondrial electron transport system (ETS), providing an additional pathway for oxygen reduction and coenzyme Q (CoQ) reoxidation, allowing continued metabolic flux in situations of ETS dysfunction. However, in flies expressing AOX, there is evidence suggesting that this enzyme cannot access CoQ reduced by complex I, but can readily access CoQ reduced by mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPDH). The hypothesis is that this occurs because complex I is frequently forming supercomplexes (SCs) with complexes III and IV, which supposedly confine CoQ molecules, providing conditions that allow AOX to interact functionally and preferentially with enzymes outside of SCs, as mGPDH. In Chapter 1 of this dissertation, we used transgenic lines of *D. melanogaster* to modulate the expression levels of *Gpo1*, a gene that encodes the ubiquitous isoform of mGPDH, and we evaluated a characteristic phenotype of AOX flies, which is pupal lethality induced by nutritional limitation. Although we observed a rescue of this lethality when *Gpo1* was overexpressed, we noticed that several of the strains used did not present the genetic-molecular characteristics necessary to be confident in the data. In Chapter 2, we sought to verify how the *Drosophila* ETS is organized in the presence and absence of AOX and in different nutritional conditions, using native blue polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). We observed changes in the distribution pattern and levels of mitochondrial complexes: 1) larvae have a greater abundance of higher molecular weight complexes and SCs than adult individuals; 2) the presence of AOX increases one of the most common forms of SCs in larvae; and 3) nutritional restriction promotes an increase in the levels of mitochondrial complexes and SCs, independently of AOX expression in larvae. Our results indicate that the molecular context of the mitochondrial inner membrane influences AOX activity.

Keywords: Mitochondria. Alternative oxidase. *Drosophila melanogaster*.
Electron transport system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AOX	Oxidase Alternativa Mitocondrial
ATP	Adenosina trifosfato
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CIV	Complexo IIII
cGPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática
CoQ	Coenzima Q
Cryo-ET	Tomografia eletrônica criogênica
EA	Enzimas Alternativas
G3P	Glicerol-3-fosfato
mGPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NDX	NADH desidrogenase alternativa
O₂	Oxigenio
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SC	Supercomplexo
SC-APM	Supercomplexos de alto peso molecular
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Mitocôndria	19
3.2	Fosforilação oxidativa (OXPHOS)	20
3.3	Supercomplexos (SCs)	23
3.4	Enzimas alternativas (EAs).	26
3.5	Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mGPDH)	28
3.6	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	30
4	CAPÍTULO I - Modulação da expressão de mGPDH na presença e ausência de AOX.	35
4.1	Introdução	35
4.2	Material e Métodos	35
4.2.1	Linhagens experimentais	35
4.2.2	Análise fenotípica	42
4.2.3	Extração de RNA e PCR quantitativo	42
4.2.4	Respirometria de alta resolução	43
4.2	Resultados	44
4.2.1	Caracterização das linhagens <i>Gpo1</i> / AOX	44
4.2.2	Ensaio de desenvolvimento utilizando a superexpressão de <i>Gpo1</i> em conjunto com a expressão da AOX.	47
4.2	Discussão	51
5	CAPÍTULO II - Obtenção e separação de complexos e supercomplexos mitocondriais de <i>Drosophila melanogaster</i> por BN-PAGE.	52
5.1	Introdução	52
5.2	Material e Métodos	52
5.2.1	Extração de mitocôndrias e BN-PAGE.	52
5.2.2	Ensaio de atividade enzimática no gel.	55

5.3	Resultados	56
5.4	Discussão	61
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	66
7	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

A mitocôndria é uma organela essencial para a maioria dos seres vivos, desempenhando um papel central no metabolismo. Um dos principais processos executados pela mitocôndria é a fosforilação oxidativa (OXPHOS), que utiliza a energia resultante da oxidação de nutrientes para a produção de adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias. O primeiro estágio desse processo consiste na redução da coenzima Q (CoQ) na membrana interna mitocondrial, podendo ser catalisado por várias enzimas distintas, complexo I(CI), complexo II(CII) que oxidam carreadores de elétrons NADH e FADH gerados no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Além destes complexos também temos a glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mGPDH), a flavoproteína de transferência de elétrons-ubiquinona oxidoredutase, prolina desidrogenase, entre outras que também estão contidas na membrana interna da mitocôndria. Em seres humanos, outros vertebrados e insetos, a reoxidação da CoQ é executada pelo complexo III (CIII), que transfere os elétrons para o citocromo c. Este último, por sua vez, é reoxidado pelo complexo IV (CIV), ao mesmo tempo em que o oxigênio (O_2) é reduzido a água. Além das reações de óxido-redução, CI, CIII e CIV promovem o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana ao mesmo tempo que executam a transferência de elétrons pela ETS. A ATP sintase pode, então, aproveitar o gradiente de prótons gerado pelo bombeamento de prótons para fosforilar a adenosina difosfato (ADP) em ATP, à medida que os prótons retornam à matriz mitocondrial (NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020) (Revisado em 3.2). Os CI, CIII e CIV podem interagir fisicamente através das subunidades peptídicas que compõem estes complexos formando conjuntos supramoleculares denominados supercomplexos (SC) (MILENKOVIC et al., 2017; VERCELLINO; SAZANOV, 2021). O SC CI-III₂-IV é como a grande maioria do CI está organizada nas mitocôndrias de mamíferos (GREGGIO et al., 2017; SCHÄGGER; PFEIFFER, 2001) o que possivelmente ajuda a transferência de elétrons do NADH para o O_2 e na prevenção do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Juntamente com os oligômeros da ATP sintase, os SCs também foram relacionados a estabilização das cristas mitocondriais (BAKER; PATEL; KHACHO, 2019), ajudando a organela a ter sua aparência característica (Revisado 3.3).

A natureza única de CI e CIII/IV por serem, respectivamente, os únicos pontos onde a CoQ sofre redução por elétrons vindos de NADH e reoxidação de CoQ por O₂ nas mitocôndrias de mamíferos, torna o sistema da cadeia respiratória mitocondrial vulnerável a disfunções (causadas por mutações ou inibição química) que podem levar a doenças como cardiomiopatia mitocondrial, doença de Parkinson, entre outras condições deletérias (RUSSELL et al., 2020).

A maioria dos organismos (incluindo a maioria dos táxons de animais, com exceção de vertebrados e insetos) possuem em seu ETS enzimas adicionais, estruturalmente mais simples, de subunidade única, que também podem catalisar de forma semelhante as reações de redução e reoxidação de CoQ descritas acima, mas sem bombeamento de prótons. Essas enzimas alternativas (EAs) podem fornecer flexibilidade metabólica ramificando a cadeia respiratória e mantendo o fluxo metabólico quando CI e/ou CIII/IV estão bloqueados ou não funcionais, mesmo que isso possa afetar a eficiência da produção de ATP (ANTOS-KRZEMINSKA; JARMUSZKIEWICZ, 2019; MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009)

As EAs animais mais bem estudadas são a NADH desidrogenase alternativa (NDX) e a AOX de *Ciona intestinalis* (Lineu, 1767), uma ascídia (Chordata: Tunicata) que tem sido usada como modelo animal em ecologia de espécies marinhas invasoras e em embriologia de cordados (BLUM et al., 2007; SATOH et al., 2003). No entanto, o contexto em que foram estudados é de aplicação biomédica como potenciais terapias para doenças mitocondriais humanas, como cardiomiopatia mitocondrial, e deficiências nos complexos que possuem funções que podem ser contornadas por EAs. Como o NDX pode ignorar a função do CI, teoricamente poderia ajudar a manter o fluxo de elétrons do NADH para a cadeia respiratória em casos de mutações genéticas que afetam qualquer uma das numerosas subunidades e fatores de montagem do CI. Da mesma forma que a AOX, recebendo elétrons diretamente da CoQ reduzindo O₂ para H₂O, assim, contornando CIII/IV, a AOX poderia ajudar na reoxidação da CoQ em caso de defeitos em qualquer um desses dois complexos. Esta ideia foi testada extensivamente em diferentes organismos modelos que naturalmente não possuem EAs, como células humanas, camundongos e moscas, com resultados diversos. Em geral, As NDX e AOX de *Ciona* promovem, respectivamente, respiração resistente à rotenona e antimicina A/cianeto, inibidores de CI e CIII/IV, para esses modelos e evitam a produção

excessiva de ROS, as enzimas alternativas podem prevenir a produção excessiva de ROS através dos complexos I e III, diminuindo o estado excessivamente reduzido dos componentes OXPHOS. As EAs também são capazes de mitigar ou resgatar o fenótipo deletérios relacionados a condições deletérias como *knockdown* de subunidades de subunidades dos CI e CIII/IV e modelos de mal Parkinson (EL-KHOURY et al., 2013; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; GOSPODARYOV et al., 2014; HAKKAART et al., 2006; SZIBOR et al., 2016).

Um aspecto interessante, é que o consumo de oxigênio catalisado por AOX não ocorre quando substratos do CI são fornecidos para mitocôndrias de células que expressam AOX, a não ser que CIII e/ou CIV sejam inibidos (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; SZIBOR et al., 2016). Entretanto, interações funcionais entre AOX e outras desidrogenases que reduzem CoQ já foram reportadas na literatura, indicando que a presença de AOX pode reorganizar significativamente a estrutura e funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial. Em plantas, quando a atividade da mGPDH é inibida, a atividade de AOX é consequentemente diminuída (SHEN et al., 2006), e em camundongos, a AOX é rapidamente ativada quando substratos do CII são utilizados como fonte oxidável sob condições de alto potencial de membrana, especialmente quando CI é inibido (SZIBOR et al., 2020). Estas interações funcionais certamente não envolvem nenhuma interação proteína-proteína entre e AOX e as desidrogenases (SHEN et al., 2006; SZIBOR et al., 2020) e, portanto, indicam que a difusão de CoQ pela membrana interna mitocondrial é a peça-chave deste fenômeno.

Um fator interessante da AOX quando expressa em *Drosophila melanogaster*, (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae) é que o efeito desacoplador da AOX esteja causando desvantagens na ETS, nosso laboratório descreveu que o desenvolvimento de moscas que expressam a AOX é comprometido quando estas são cultivadas em um meio com baixa disponibilidade de nutrientes. Aproximadamente 70% dos indivíduos não completam o seu desenvolvimento até a fase adulta nesta condição, morrendo no estágio de pupa, enquanto a viabilidade de moscas controles que não expressam AOX não é modificada pela dieta pobre em nutrientes. As moscas AOX precisam de ingredientes mais complexos que são encontrados no meio de cultivo padrão (rico em nutrientes), tais como melaço de cana ou farinha de milho, para completarem normalmente o seu desenvolvimento, indicando que existem alterações no metabolismo mitocondrial decorrentes da

presença da AOX que acarretam em uma demanda diferente por nutrientes (SAARI et al., 2019b).

A mGPDH em insetos como *D. melanogaster*, mGPDH e glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática (cGPDH) têm grande importância no músculo do voo, formando uma lançadeira que reoxida NAD⁺ citoplasmático para reutilização na glicólise, reduzindo diretamente CoQ na membrana interna mitocondrial e fornecendo elétrons para CIII e CIV. Disfunções ou mutações em qualquer uma das duas enzimas GPDHs prejudicam a capacidade de voo dos adultos (CARMON et al., 2010); como também, em conjunto com a enzima lactato desidrogenase, esse sistema é necessário ao desenvolvimento larval, pois as vias trabalham de maneira compensatória para manter o metabolismo regulado durante o desenvolvimento larval (LI et al., 2019).

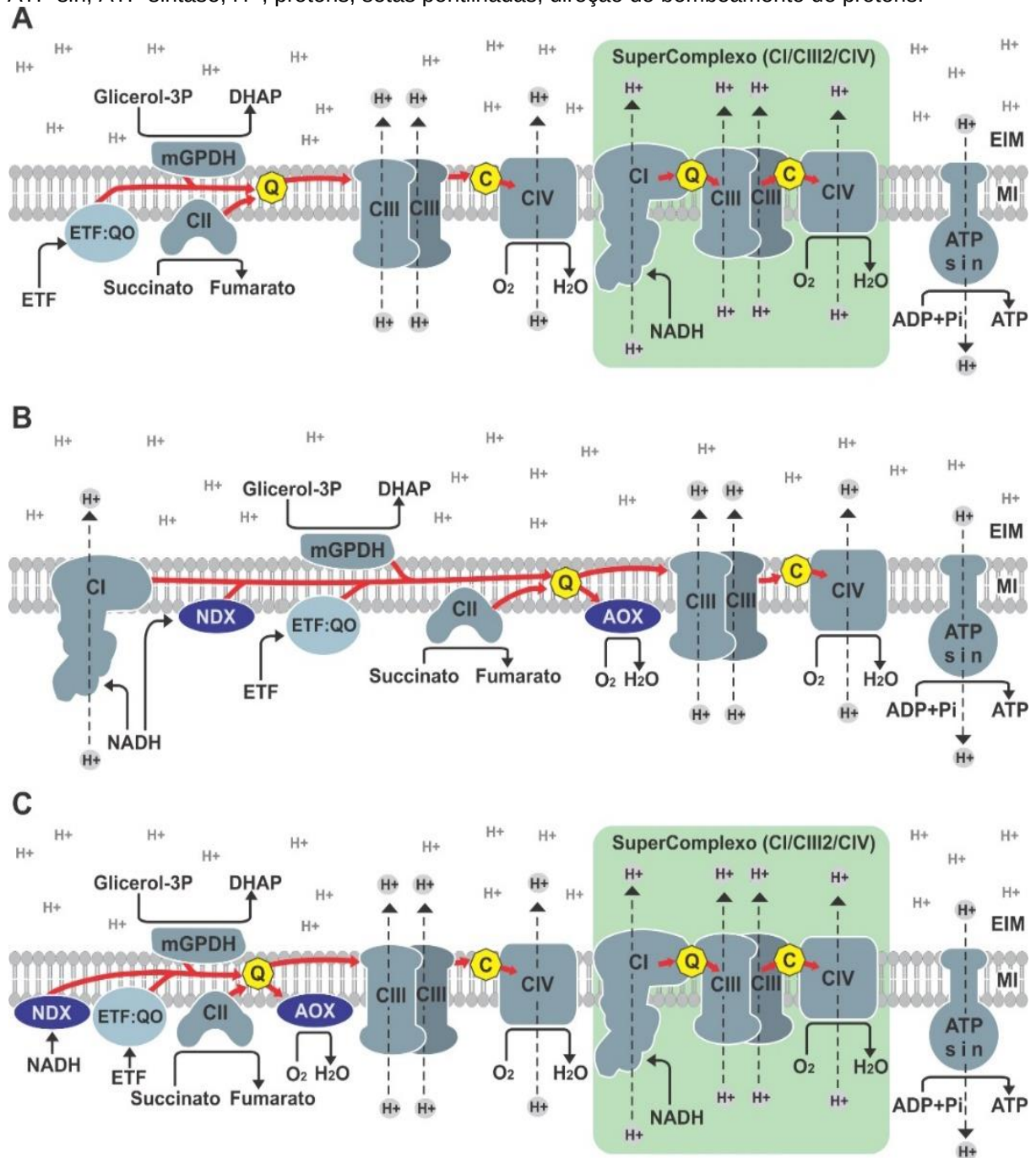
Não existe nenhum trabalho até o momento que mostre a associação da mGPDH com estruturas como os SCs (Figura 1.A), entretanto, resultados de respirometria de alta resolução do nosso laboratório recém submetidos a publicação demonstram que a AOX parece ter acesso facilitado aos elétrons via mGPDH. A AOX expressa transgenicamente em *D. melanogaster* oxida uma porção significativa do pool de CoQ que foi reduzido pela mGPDH, especialmente em condições de alto potencial de membrana mitocondrial. Entretanto quando apenas o CI está recebendo substratos, em condições de alto potencial de membrana, a AOX só consegue acessar as CoQ reduzidas via CI quando existe a inibição do CIII com antimicina A, o que provoca um grande aumento da respiração dependente de AOX, indicando que os elétrons vindos do CI preferencialmente chegam ao CIII e só conseguem acessar a AOX quando existe uma disrupção nesse sistema neste caso causada pela inibição de CIII.

Provavelmente na membrana interna mitocondrial de moscas expressando AOX, a mGPDH e a AOX se interagem funcionalmente, gerando um sistema paralelo de transferência de elétrons que desacopla as mitocôndrias (Figura 1.C). Em contrapartida, a maior parte dos elétrons vindos do CI chegam ao CIII e CIV por causa da formação de SCs, garantindo a síntese de ATP por meio da oxidação do NADH gerado na matriz mitocondrial. A nossa hipótese é que AOX interage preferencialmente com CoQ reduzidas por desidrogenases não associadas a SCs como a mGPDH.

O aprisionamento de moléculas de CoQ nos SCs CI-CIII₂-CIV evitaria a ação da AOX quando esta molécula é reduzida pelo CI, a não ser que CIII ou CIV sejam bloqueados, liberando as CoQ pela membrana interna (SZIBOR et al., 2020). Dados do nosso laboratório também apontam para possibilidade de que a *Ciona intestinalis* assim como outros tunicados detentores de EAs podem não formar SCs (ver Figura 1.B), pois não possuem subunidades centrais para formação e estabilização deste tipo de estrutura em seu genoma.

Figura 1: Hipótese de organizações distintas da ETS em animais.

(A), ETS de mamíferos, outros vertebrados e insetos, mostrando enzimas flutuantes individualmente (lado esquerdo) e supercomplexos (retângulo verde claro, lado direito). Este último diminui a produção de ROS, facilitando a transferência de elétrons (setas vermelhas) do NADH para o O_2 . Observe os pools separados de coenzima Q (Q) e citocromo c (C) criados pela formação de supercomplexos. (B), Arranjo putativo da cadeia respiratória de tunicados, mostrando as enzimas alternativas NDX e AOX, e sem SCs. As enzimas alternativas podem prevenir a produção excessiva de ROS através dos complexos I e III, diminuindo o estado excessivamente reduzido dos componentes OXPHOS. (C), Representação de como *Ciona* NDX e AOX estão dispostos na ETS de camundongo e *D. melanogaster* quando expressos xenotopicamente, excluídos dos supercomplexos. MI, membrana mitocondrial interna; EIM, espaço intermembranar mitocondrial; CI-IV, complexos I-IV; ATP sin, ATP sintase; H^+ , prótons; setas pontilhadas, direção do bombeamento de prótons.



Fonte: próprio autor, 2024

Caso estes animais realmente não possuam SCs na sua OXPHOS, fortalece-se a hipótese de que a AOX de *Ciona* interaje de forma funcional preferencialmente com desidrogenases que não se encontram na forma de SC na membrana interna, como deve ser caso de mGPDH.

A utilização de *D. melanogaster*, um organismo modelo de fácil manipulação genética (ver tópico 3.6), é propícia para se analisar esta possível interação genética, uma vez que a função de mGPDH já está bem caracterizada (LI et al., 2019) (ver tópico 3.5). A utilização de moscas mutantes com níveis alterados de mGPDH em conjunto com a expressão da AOX, cultivadas em condições de dieta rica e restrita em nutrientes, sendo este último onde ocorre o fenótipo deletério de letalidade pupal pela expressão da AOX. Hipotetizamos que este fenótipo pode ser alterado pela decorrente das mudanças dos níveis de mGPDH, intensificado quando mGPDH for superexpressa, ou diminuído/abolido quando mGPDH for depletada ou estiver ausente, sendo um indício na potencialização ou amenização do sistema paralelo de transporte de elétrons entre a interação mGPDH-AOX, indicando, deste modo uma interação genética entre estas enzimas.

Dado o potencial terapêutico da AOX, é crucial compreender como ela interage com outras enzimas da OXPHOS. Isso é essencial para avaliar os benefícios e possíveis efeitos colaterais da expressão da AOX em terapias genéticas. No entanto, a literatura disponível sobre SCs em *D. melanogaster* é limitada, com a maioria dos estudos concentrando-se em organismos adultos, e não há dados relacionados aos estágios larvais. A dinâmica da formação de SCs em *Drosophila* é ainda pouco compreendida, quando comparada aos mamíferos e existem dados conflitantes entre autores (SHIMADA et al., 2018; WEAVER; MCDONALD, 2023). Tratando-se de um organismo modelo de tamanha importância para estudos biomédicos, isso é uma questão fundamental a ser compreendida.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou variações nos níveis de complexos e supercomplexos mitocondriais de *D. melanogaster* decorrentes de diferenças de estágios do desenvolvimento (adultos e larvas), da condição nutricional em larvas e pela presença ou não AOX. Análises mais robustas, como espectrometria de massas para a obtenção dos complexosomas e Cryo-ET para obtenção de estruturação das cristas mitocondriais, serão necessárias para uma caracterização mais refinada sobre a distribuição e os níveis exatos dos complexos e SCs em cada uma das condições analisadas, assim como possíveis alterações estruturais na mitocôndria, especialmente em relação a organização das cristas. Este projeto foi agraciado com um *Travel Grant* da Boehringer Ingelheim Fonds para treinamento em Cryo-ET na Universidade de Maastricht na Holanda, durante a realização deste travel grant também permitiu a obtenção de tomografias de Cryo-ET de amostras de larvas de *D. melanogaster* isso permitiu dar os passos iniciais da continuidade deste trabalho que serão seguidas em um projeto de doutorado subsequente.

Concluimos que embora não tenhamos conseguido demonstrar a interação entre mGPDH e AOX, este trabalho oferece contribuições significativas para a ciência, pois nossos resultados sobre os níveis dos complexos e SCs em diferentes condições oferecem insights significativos sobre a biologia mitocondrial de *D. melanogaster* e dos impactos da AOX. Trazendo dados inéditos que permitem visualizar diferenças na distribuição dos complexos da ETS entre adultos e larvas, assim como os efeitos da condição nutricional na organização e nos níveis de complexos e SCs em larvas. Estes dados contribuem para conhecimento sobre a fisiologia e o metabolismo larval deste poderoso organismo modelo. E por fim os resultados obtidos sobre o impacto da AOX na distribuição de complexos e SCs amplia a compreensão dos impactos funcionais desta enzima sobre a ETS em diferentes condições nutricionais, contribuindo para os estudos desta enzima em uma possível terapia genica.

7 REFERÊNCIAS

ANDJELKOVIĆ, A. et al. Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 18295, 17 dez. 2015.

ANDJELKOVIĆ, A. et al. Expression of the Alternative Oxidase Influences Jun N-Terminal Kinase Signaling and Cell Migration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 38, n. 24, 1 dez. 2018.

ANTOS-KRZEMINSKA, N.; JARMUSZKIEWICZ, W. Alternative Type II NAD(P)H Dehydrogenases in the Mitochondria of Protists and Fungi. **Protist**, v. 170, n. 1, p. 21–37, fev. 2019.

BAKER, N.; PATEL, J.; KHACHO, M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. **Mitochondrion**, v. 49, p. 259–268, nov. 2019.

BELLEN, H. J. et al. The BDGP Gene Disruption Project. **Genetics**, v. 167, n. 2, p. 761–781, 1 jun. 2004.

BIER, E. et al. Advances in Engineering the Fly Genome with the CRISPR-Cas System. **Genetics**, v. 208, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2018.

BLUM, J. C. et al. The non-native solitary ascidian *Ciona intestinalis* (L.) depresses species richness. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, n. 1, p. 5–14, mar. 2007.

BRANDT, T. et al. Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. **eLife**, v. 6, 12 jul. 2017.

BRISCHIGLIARO, M. et al. Measurement of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities in *Drosophila melanogaster* samples. **STAR Protocols**, v. 3, n. 2, p. 101322, jun. 2022a.

BRISCHIGLIARO, M. et al. CG7630 is the *Drosophila melanogaster* homolog of the cytochrome c oxidase subunit COX7B. **EMBO reports**, v. 23, n. 8, 3 ago. 2022b.

CARMON, A. et al. The Glycerophosphate Cycle in *Drosophila melanogaster* V. Molecular Analysis of Glycerophosphate Dehydrogenase and Glycerophosphate Oxidase Mutants. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 2, p. 218–224, 1 mar. 2010.

CARMON, A.; MACINTYRE, R. The α Glycerophosphate Cycle in *Drosophila melanogaster* VI. Structure and Evolution of Enzyme Paralogues in the Genus *Drosophila*. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 2, p. 225–234, 2010.

CELNIKER, S. E.; RUBIN, G. M. The *Drosophila Melanogaster* Genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 4, n. 1, p. 89–117, set. 2003.

- CHATTERJEE, N.; PERRIMON, N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. **Science Advances**, v. 7, n. 24, 11 jun. 2021.
- CHEN, W.; ZHAO, H.; LI, Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 333, 6 set. 2023.
- CHOWDHURY, S. K. R.; GEMIN, A.; SINGH, G. High activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and glycerophosphate-dependent ROS production in prostate cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 4, p. 1139–1145, ago. 2005.
- D'AGOSTINO, Y.; D'ANIELLO, S. Molecular basis, applications and challenges of CRISPR/Cas9: a continuously evolving tool for genome editing. **Briefings in Functional Genomics**, p. elw038, 5 jan. 2017.
- DASSA, E. P. et al. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. **EMBO Molecular Medicine**, v. 1, n. 1, p. 30–36, 26 abr. 2009.
- DEL VALLE RODRÍGUEZ, A.; DIDIANO, D.; DESPLAN, C. Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. **Nature Methods**, v. 9, n. 1, p. 47–55, 28 jan. 2012.
- DOGAN, S. A. et al. Perturbed Redox Signaling Exacerbates a Mitochondrial Myopathy. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 764–775.e5, nov. 2018.
- EL-KHOURY, R. et al. Alternative Oxidase Expression in the Mouse Enables Bypassing Cytochrome c Oxidase Blockade and Limits Mitochondrial ROS Overproduction. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003182, 3 jan. 2013.
- EL-KHOURY, R. et al. Expression of the alternative oxidase mitigates beta-amyloid production and toxicity in model systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 57–66, jul. 2016.
- EWEN-CAMPEN, B. et al. Optimized strategy for in vivo Cas9-activation in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 9409–9414, 29 ago. 2017.
- FERNANDEZ-AYALA, D. J. M. et al. Expression of the *Ciona intestinalis* Alternative Oxidase (AOX) in *Drosophila* Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 449–460, maio 2009.
- GALLAGHER, S. R. Digital Image Processing and Analysis with ImageJ. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 9, n. 1, 28 nov. 2014.
- GARCIA, G. S. et al. An Affordable and Efficient “Homemade” Platform for *Drosophila* Behavioral Studies, and an Accompanying Protocol for Larval Mitochondrial Respirometry. **Journal of Visualized Experiments**, n. 175, 24 set. 2021.

GOSPODARYOV, D. V. et al. *Ciona intestinalis* NADH dehydrogenase NDX confers stress-resistance and extended lifespan on *Drosophila*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1837, n. 11, p. 1861–1869, nov. 2014.

GOSPODARYOV, D. V. et al. Alternative NADH dehydrogenase extends lifespan and increases resistance to xenobiotics in *Drosophila*. **Biogerontology**, v. 21, n. 2, p. 155–171, 20 abr. 2020.

GREGGIO, C. et al. Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 301–311, fev. 2017.

HAKKAART, G. A. J. et al. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. **EMBO reports**, v. 7, n. 3, p. 341–345, 2 mar. 2006.

HARNISH, J. M.; LINK, N.; YAMAMOTO, S. *Drosophila* as a Model for Infectious Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2724, 8 mar. 2021.

HEGDE, K. N.; SRIVASTAVA, A. *Drosophila melanogaster* as a Tool for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research. **Journal of Developmental Biology**, v. 10, n. 3, p. 36, 30 ago. 2022.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, P.; ENRÍQUEZ, J. A. Functional segmentation of CoQ and cytochrome c pools by respiratory complex superassembly. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 167, p. 232–242, maio 2021.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, P.; ENRÍQUEZ, J. A. Alternative respiratory oxidases to study the animal electron transport chain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1864, n. 1, p. 148936, jan. 2023.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656–662, dez. 2018.

JACOBS, H. T. et al. AOX delays the onset of the lethal phenotype in a mouse model of Uqcrrh (complex III) disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1869, n. 7, p. 166760, out. 2023.

JACOBS, H. T.; GEORGE, J.; KEMPPAINEN, E. Regulation of growth in *Drosophila melanogaster*: the roles of mitochondrial metabolism. **The Journal of Biochemistry**, v. 167, n. 3, p. 267–277, 1 mar. 2020.

JHA, P.; WANG, X.; AUWERX, J. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–14, mar. 2016.

KEMPPAINEN, K. K. et al. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 8, p. 2078–2093, 15 abr. 2014.

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**, v. 4, n. 10, p. 2013–2021, 1 out. 2014.

KOEHLER, S.; HUBER, T. B. Insights into human kidney function from the study of *Drosophila*. **Pediatric Nephrology**, v. 38, n. 12, p. 3875–3887, 12 dez. 2023.

LI, H. et al. Lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase cooperatively regulate growth and carbohydrate metabolism during *Drosophila melanogaster* larval development. **Development**, 1 jan. 2019.

LING, D.; SALVATERRA, P. M. Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17762, 15 mar. 2011.

LIU, X. et al. Mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase promotes skeletal muscle regeneration. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, 2 dez. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MATUS-ORTEGA, M. G. et al. The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 256–263, set. 2011.

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

MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C.; STAPLES, J. F. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 16, p. 2627–2634, 15 ago. 2009.

MILENKOVIC, D. et al. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 765–776, abr. 2017.

MILLER, D. E.; COOK, K. R.; HAWLEY, R. S. The joy of balancers. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 11, p. e1008421, 7 nov. 2019.

MORATA, G.; LAWRENCE, P. An exciting period of *Drosophila* developmental biology: Of imaginal discs, clones, compartments, parasegments and homeotic genes. **Developmental Biology**, v. 484, p. 12–21, abr. 2022.

MÜHLEIP, A. et al. Structural basis of mitochondrial membrane bending by the I–II–III₂–IV₂ supercomplex. **Nature**, v. 615, n. 7954, p. 934–938, 30 mar. 2023.

MURARI, A.; OWUSU-ANSAH, E. Analyzing the integrity of oxidative phosphorylation complexes in *Drosophila* flight muscles. **STAR Protocols**, v. 2, n. 4, p. 101021, dez. 2021.

NICHOLLS, D. G. Fifty years on: How we uncovered the unique bioenergetics of brown adipose tissue. **Acta Physiologica**, v. 237, n. 4, 6 abr. 2023.

NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v. 37, p. 101674, out. 2020.

OLIVEIRA, M. T. et al. Boosting life sciences research in Brazil: building a case for a local *Drosophila* stock center. **Genetics and Molecular Biology**, v. 47, n. 1, 2024.

ONDA, Y. et al. Functional Coexpression of the Mitochondrial Alternative Oxidase and Uncoupling Protein Underlies Thermoregulation in the Thermogenic Florets of Skunk Cabbage. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 323–324, 4 fev. 2008.

ORMEROD, K. G. et al. *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. **Fly**, v. 11, n. 3, p. 153–170, 3 jul. 2017.

POSSIK, E. et al. New Mammalian Glycerol-3-Phosphate Phosphatase: Role in β -Cell, Liver and Adipocyte Metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 13 jul. 2021.

PROTASONI, M.; ZEVIANI, M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 586, 8 jan. 2021.

RAJENDRAN, J. et al. Alternative oxidase-mediated respiration prevents lethal mitochondrial cardiomyopathy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, 10 jan. 2019.

RHOOMS, S.-K. et al. Insights from *Drosophila* on mitochondrial complex I. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 607–618, 4 fev. 2020.

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**, v. 8, n. 1, p. 10882, 18 jul. 2018.

ROY, A. et al. Mitochondrial DNA replication and repair defects: Clinical phenotypes and therapeutic interventions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1863, n. 5, p. 148554, jun. 2022.

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

SAARI, S. et al. Expression of *Ciona intestinalis* AOX causes male reproductive defects in *Drosophila melanogaster*. **BMC Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 9, 3 jul. 2017.

SAARI, S. et al. Alternative respiratory chain enzymes: Therapeutic potential and possible pitfalls. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 4, p. 854–866, abr. 2019a.

SAARI, S. et al. Alternative oxidase confers nutritional limitation on *Drosophila* development. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 331, n. 6, p. 341–356, 20 jul. 2019b.

ŞAHİN, M.; AYBEK, E. Jamovi: An Easy to Use Statistical Software for the Social Scientists. **International Journal of Assessment Tools in Education**, v. 6, n. 4, p. 670–692, 5 jan. 2020.

SAJWAN, S.; MANNERVIK, M. Gene activation by dCas9-CBP and the SAM system differ in target preference. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18104, 2 dez. 2019.

SANZ, A. et al. Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in *Drosophila*. **Aging**, v. 2, n. 4, p. 200–223, 15 abr. 2010.

SATOH, N. et al. *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 7, p. 376–381, jul. 2003.

SCHÄGGER, H.; PFEIFFER, K. The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I–V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37861–37867, out. 2001.

SCIALÒ, F. et al. Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 725–734, abr. 2016.

SHEN, W. et al. Involvement of a Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Modulating the NADH/NAD⁺ Ratio Provides Evidence of a Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Shuttle in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 18, n. 2, p. 422–441, 1 fev. 2006.

SHIMADA, S. et al. A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1859, n. 2, p. 154–163, fev. 2018.

SZIBOR, M. et al. Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **Disease Models & Mechanisms**, 1 jan. 2016.

SZIBOR, M. et al. Bioenergetic consequences from xenotopic expression of a tunicate AOX in mouse mitochondria: Switch from RET and ROS to FET. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1861, n. 2, p. 148137, fev. 2020.

TANG, J. X. et al. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3820, 28 maio 2020.

THAKUR, S. et al. Metformin Targets Mitochondrial Glycerophosphate Dehydrogenase to Control Rate of Oxidative Phosphorylation and Growth of Thyroid Cancer *In Vitro* and *In Vivo*. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 16, p. 4030–4043, 15 ago. 2018.

THURMOND, J. et al. FlyBase 2.0: the next generation. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D759–D765, 8 jan. 2019.

TIMÓN-GÓMEZ, A. et al. Protocol for the Analysis of Yeast and Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes and Supercomplexes by Blue Native Electrophoresis. **STAR Protocols**, v. 1, n. 2, p. 100089, set. 2020.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 1 mar. 2016.

VARTIAINEN, S. et al. Phenotypic rescue of a *Drosophila* model of mitochondrial ANT1 disease. **Disease Models & Mechanisms**, 1 jan. 2014.

VERCELLINO, I.; SAZANOV, L. A. Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII2CIV. **Nature**, v. 598, n. 7880, p. 364–367, 14 out. 2021.

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**, v. 140, n. 4, p. 1367–1373, 1 abr. 2006.

WEAVER, R. J.; MCDONALD, A. E. Mitochondrial alternative oxidase across the tree of life: Presence, absence, and putative cases of lateral gene transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1864, n. 4, p. 149003, nov. 2023.

XU, Y. et al. Assembly of the complexes of oxidative phosphorylation triggers the remodeling of cardiolipin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 23, p. 11235–11240, 4 jun. 2019.

ZIRIN, J. et al. State-of-the-art CRISPR for in vivo and cell-based studies in *Drosophila*. **Trends in Genetics**, v. 38, n. 5, p. 437–453, maio 2022.