RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 01/09/2025

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

Marina Minari Chioda

A oxidase alternativa causa alterações de massa corporal e metabolismo de lipídeos em *Drosophila melanogaster*

São José do Rio Preto
2023

Marina Minari Chioda

A oxidase alternativa causa alterações de massa corporal e metabolismo de lipídeos em *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto

2023

C539o

Chioda, Marina Minari
A oxidase alternativa causa alterações de massa corporal e metabolismo de lipídeos em Drosophila melanogaster / Marina Minari Chioda. -- São José do Rio Preto, 2023
206 p. : il., tabs.

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

1. Mitocôndria. 2. Drosophila melanogaster. 3. Proteômica. 4. Oxidase Alternativa. 5. Restrição nutricional. 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.

Marina Minari Chioda

A oxidase alternativa causa alterações de massa corporal e metabolismo de lipídeos em *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
Unesp/Jaboticabal
Orientador

Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro
Unesp/Jaboticabal

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Kênia Cardoso Bicego
Unesp/Jaboticabal

Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani
Unesp/Jaboticabal

São José do Rio Preto

01 de setembro de 2023

À minha mãe, que sempre lutou e
enfrentou tudo por mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro e mais alto lugar, ao dono de todas as coisas, ao Senhor da minha vida. Meu motivo de prosseguir e minha fonte inesgotável de força.

Aos meus pais, Ricardo (*in memoriam*) e Eliana, por sempre terem sido o melhor que conseguiram ser. Agradeço por me darem a vida e me ensinarem princípios e valores inegociáveis.

Ao Sérgio, por ser antes de tudo meu melhor amigo. Por me acolher, incentivar e ensinar sobre resistência e resiliência. Por nunca soltar a minha mão, por ser meu abrigo e me trazer a calmaria necessária para cada etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira, pela nossa longa e incrível trajetória juntos. Por todo empenho na minha formação e pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou.

Aos queridos André, Ana Paula e Geovana pela verdadeira amizade, suporte e alegria que me proporcionaram todos os dias. Vocês seguraram a minha mão e me deram fortes motivos para não desistir. Não havia a possibilidade de não nos encontrarmos nessa vida!

À Dra. Amanda C. Baldassi, pela amizade, cafés e ombro amigo. Por todo suporte e auxílio na análise dos dados de espectrometria de massas.

A Naiara, Andreia, Maria Clara e Ana Carolina que se tornaram abrigo, acolhimento e apoio. Vocês deixaram a jornada mais leve e possível.

Aos que são ou passaram pelo Laboratório de Biologia Mitocondrial. Cada um tem um lugar especial em meu coração. Agradeço por terem contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional e por todos os bons momentos.

Ao Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena, pela efetiva contribuição na obtenção dos dados de espectrometria de massas. Por ser sempre tão paciente e gentil.

Ao Depto. de Biotecnologia da FCAV – docentes, alunos e funcionários – por sempre me tratarem com tanto carinho. Pelas conversas, cafés e boas risadas.

Ao Ibilce pela oportunidade de concluir minha formação nesta instituição. Agradeço especialmente aos funcionários da seção de pós-graduação por serem sempre tão eficientes, solícitos e acima de tudo gentis.

À FCAV/Unesp – Jaboticabal e ao CREBIO pelo espaço disponibilizado.

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.

RESUMO

A oxidase alternativa mitocondrial (AOX) catalisa reações químicas redox análogas àquelas catalisadas pelos complexos III e IV (CIII e CIV) da cadeia respiratória mitocondrial (CR), sem contribuir para a força próton-motriz necessária à síntese de ATP. Essa característica, atrelada à ausência natural dessa enzima em humanos, sugere que a expressão xenotópica da AOX pode ser uma opção terapêutica quando um desses complexos está comprometido, já que o fluxo de elétrons seria mantido, culminando na redução de oxigênio molecular. Quando testada em células humanas em cultura, *Drosophila melanogaster* e em camundongos, a expressão de AOX foi capaz de resgatar problemas relacionados a diversas disfunções mitocondriais. Entretanto, quando moscas expressando AOX se desenvolvem em uma dieta pobre em nutrientes, uma queda de aproximadamente 80% na taxa de emergência dos adultos é observada, indicando possíveis efeitos colaterais graves associados à expressão de AOX que precisam ser investigados. Neste trabalho, utilizamos a proteômica para investigar alterações moleculares associadas ao período logo antes da letalidade, na fase de pupa. Os dados sugerem uma elevação nos níveis das enzimas que participam do ciclo do ácido tricarboxílico, da β-oxidação e da degradação de corpos cetônicos, além de uma elevação em subunidades dos complexos que constituem a CR. Esses fatores indicam um aumento no metabolismo de lipídeos induzido por AOX que pode estar acarretando uma depleção exagerada das reservas lipídicas pupais. A massa corporal e a taxa de hidratação corpórea de larvas e pupas são severamente afetadas em indivíduos AOX cultivados em dieta pobre em nutrientes, mas a quantidade de gordura relativa se mantém constante, sugerindo que a síntese de impermeabilizantes corpóreos a partir dos lipídeos estocados durante a fase de larva não acontece eficientemente. Esse trabalho mostra que a compreensão detalhada dos mecanismos e alterações causadas pela AOX é fundamental para que essa enzima seja implementada de forma segura em futuras terapias gênicas.

Palavras-chave: Oxidase alternativa. Metabolismo de lipídeos. *Drosophila melanogaster.*

ABSTRACT

The alternative oxidase (AOX) is an enzyme that catalyzes redox reactions similarly to those catalyzed by the mitochondrial respiratory chain complexes III and IV, without contributing to the proton-motive force required for ATP synthesis. This characteristic, along with the natural absence of this enzyme in humans, suggests that xenotopic expression of AOX may be a therapeutic option when one of these complexes is compromised, since electron flow and O_2 reduction would still be maintained. When tested in human cells in culture, *Drosophila melanogaster* and mice, AOX expression was able to rescue diverse problems related to various mitochondrial dysfunction. However, when AOX-expressing flies developed in a low-nutrient diet (LN), a decrease of approximately 80% in adult emergence was observed, indicating a negative effect associated with AOX expression that need to be further investigated. Here, we used proteomics to probe the molecular alterations associated with the AOX-induced pupal lethality. The data suggest increased levels of tricarboxylic acid cycle, β-oxidation, and ketone body degradation enzymes, as well as of subunits of respiratory chain complexes. This indicates an increase in fatty acid catabolism and a general change in lipid metabolism when AOX is expressed, which may be causing a depletion in pupal lipid reserves. Larval and pupal body mass and body hydration rate were severely affected in AOX flies cultured on LN, but the relative amount of fat remained constant, suggesting that the conversion of stored lipids into body waterproofing molecules during the pupa stage does not occur efficiently. This study shows that a detailed understanding of the alterations caused by AOX is essential for this enzyme to be safely deployed in possible future gene therapies.

Keywords: Alternative oxidase. Lipid Metabolism. *Drosophila melanogaster.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- O ciclo de vida de *D. melanogaster* 15

Figura 2 - Acoplamento de vias anabólicas e catabólicas 20

Figura 3 - O ciclo do TCA com todos os intermediários, produtos metabólicos e enzimas 24

Figura 4 - As reações anapleróticas e catapleróticas dentro do ciclo do TCA 26

Figura 5 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial 28

Figura 6 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial na presença de vias alternativas 29

Figura 7 - Ilustração das amostras que foram processadas e injetadas no espectrômetro de massas para obtenção dos dados proteômicos 40

Figura 8 - Número de proteínas diferencialmente expressas identificadas para o extrato proteico total (EPT) e o extrato mitocondrial puro (EMP) 41

Figura 9 - Dados proteômicos sugerem uma tendência na diminuição da síntese proteica em pupas cultivadas em condição de restrição nutricional 43

Figura 10 - Expressão de AOX causa uma tendência de aumento nos níveis de proteínas mitocondriais 44

Figura 11 - Proteínas ribossomais estão diminuídas quando AOX é expressa em LN (interação) 45

Figura 12 - Resumo ilustrativo das vias mitocondriais alteradas por AOX em moscas em estágio de pré-farato da fase de pupa 46

Figura 13 - A combinação entre moscas expressando AOX em dieta LN afeta a massa corporal, a quantidade de gordura relativa e a hidratação de pupas 49

Figura 14 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial com vias paralelas para o de fluxo de elétrons na presença de AOX 53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 OBJETIVO GERAL 12
2.1 Objetivo específico 12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
3.1 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico 13
3.2 Desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* 14
3.3 Ferramentas moleculares para manipulação genética em *D. melanogaster* 16
3.4 Metabolismo energético 18
3.5 Mitocôndrias 20
3.5.1 Dinâmica mitocondrial 21
3.5.2 Ciclo do Ácido Tricarboxílico 23
3.5.3 Cadeia respiratória 26
3.5.4 Enzimas alternativas 28
3.5.5 Doenças mitocondriais 29
3.6 Expressão xenotópica de AOX em modelos biológicos 30
3.7 Metabolismo de lipídeos em *Drosophila melanogaster* 31
4 MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1 Linhagens Utilizadas 34
4.2 Dietas 34
4.3 Obtenção e Processamento dos Extratos Proteicos 34
4.4 Digestão de proteínas *in gel* e análise por espectrometria de massas 36
4.5 Identificação e quantificação da abundância relativa de proteínas 37
4.6 Quantificação da Massa Corporal e Gordura Relativa 38
5 RESULTADOS 39
5.1 Proteômica indica alterações no metabolismo de lipídeos induzidas pela AOX 39
5.2 Expressão da AOX associada à dieta LN leva a diferenças de massa corporal e quantidade relativa de lipídeos durante o desenvolvimento de drosófila 47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 51
REFERÊNCIAS 57
APÊNDICE A – Tabela suplementar 1 64
APÊNDICE B - Tabela suplementar 2 191

1 INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas que desempenham papéis importantes nas células eucarióticas (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Os processos realizados nessa organela são de extrema relevância, no entanto, a produção de trifosfato de adenosina (ATP) via fosforilação oxidativa (OXPHOS) possui um papel central. A OXPHOS ocorre na cadeia respiratória mitocondrial (CR) que é composta por cinco complexos (CI-CIV e ATP sintase) proteicos integrais de membrana localizadas na membrana interna da mitocôndria (MIM) (GUO et al., 2018). Disfunções nesses complexos podem levar à deficiência na produção de ATP, além de formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), fatores que estão intimamente relacionados a uma grande quantidade de doenças (MUNNICH; RUSTIN, 2001).

Grande parte dos eucariotos, incluindo os animais, possuem enzimas que fornecem vias alternativas à CR, no entanto, vertebrados e insetos não as têm (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019). Uma dessas vias é constituída pela oxidase alternativa (AOX), cuja utilização aparentemente só ocorre quando há comprometimentos da via clássica, que podem ser causados por diversos fatores, como elevado potencial de membrana, inibição da CR por toxinas ou problemas genéticos associados a alguns dos complexos (DOGAN et al., 2018; KEMPPAINEN et al., 2014). Devido à AOX possuir a função de química redox semelhante aos CIII e CIV, foi postulado que sua expressão xenotópica em células humanas com deficiências nesses complexos, incluindo células de pacientes humanos com doenças mitocondriais, poderia aliviar os efeitos negativos dessas deficiências (DASSA et al., 2009; HAKKAART et al., 2006; RUSTIN; JACOBS, 2009). Com isso, testes foram feitos expressando AOX em mitocôndrias de *Drosophila melanogaster*, camundongos e células humanas em cultura, que naturalmente não possuem essa enzima. Os resultados mostraram que AOX confere resistência à antimicina A e a cianeto, inibidores de CIII e CIV, além de aliviar sintomas associados a problemas neurodegenerativos, de locomoção, entre outros (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). Apesar de AOX se mostrar promissora e apresentar efeitos positivos quando expressa xenotopicamente em modelos biológicos, quando moscas expressando AOX ubiquamente em altos níveis foram submetidas a uma dieta restrita em nutrientes (LN), estas apresentaram queda de cerca de 80% na taxa de emergência dos adultos (SAARI et al., 2019a). Nenhuma suplementação feita em dieta LN com compostos

simples testados isoladamente ou em combinação, tais como açúcares, vitaminas, minerais e uma quantidade extra de extrato de levedura foram capazes de resgatar o fenótipo de letalidade (SAARI et al., 2019b). Entretanto, o melaço de cana, gérmen de trigo, farinha de soja e farinha de milho foram capazes de resgatar este fenótipo quando adicionados à dieta LN. A análise do metaboloma da fração aquosa do melaço identificou uma grande quantidade de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), entre outras moléculas (SAARI et al., 2019b). Isso sugere que a atuação da AOX no metabolismo desses indivíduos é complexa e, portanto, uma investigação detalhada a nível molecular é indispensável para a compreensão da resposta metabólica de moscas AOX frente a condições de restrição nutricional. É neste contexto que o trabalho apresentado nesta tese se insere.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão de AOX proveniente de *C. intestinalis* em modelos biológicos, incluindo *D. melanogaster*, proporciona diversos benefícios, muitos deles devido à capacidade dessa enzima de diminuir EROs e de manter o fluxo de elétrons mesmo quando há defeitos no CIII e CIV (DASSA et al., 2009; EL-KHOURY et al., 2013, 2016; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; GIORDANO et al., 2019; HUMPHREY et al., 2012; KEMPPAINEN et al., 2014; RAJENDRAN et al., 2019; SZIBOR et al., 2016; VARTIAINEN et al., 2014). Apesar disso, a expressão xenotópica da AOX apresentou algumas desvantagens significativas quando sujeita a condições de restrição nutricional. Quando os indivíduos com AOX foram submetidos a uma dieta LN, houve uma redução de cerca de 80% na taxa de emergência dos adultos (SAARI et al., 2019a, 2019b). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse fenótipo ainda são desconhecidos e uma análise global das proteínas expressas nessas condições poderia fornecer pistas sobre quais alterações a AOX está causando nesses animais. Nesse contexto, empregamos uma análise de proteômica quantitativa para contribuir na
compreensão dessas alterações.

Nossos dados mostraram que em condição de restrição nutricional há uma queda substancial nos níveis de proteínas envolvidas na síntese proteica, tanto em moscas que expressam AOX quanto nas que não expressam. É sabido que moscas cultivadas em dietas com reduzido teor nutricional apresentam um declínio na proliferação celular de muitos tecidos e na taxa de crescimento do organismo (LANET; MAURANGE, 2014), o que é coerente com nossos achados. Sabe-se também que a mitocôndria tem alta relevância no que diz respeito a ajustes metabólicos diante da variação nutricional, de acordo com as reservas energéticas disponíveis, de forma que o processo de OXPHOS seja regulado/reconfigurado de acordo com as necessidades celulares (CORMIER et al., 2019). Diante de limitações nutricionais, o corpo gorduroso produz uma variedade de citocinas que entram na hemolinfa e são captadas pelas IPCs (IPCs, do inglês Insulin-Producing Cells) no sistema nervoso central, induzindo a produção das DILPs1, 2, 3 e 5 (peptídeos semelhantes à insulina em *Drosophila*) (LEHMANN, 2018). Uma vez que esse mecanismo ocorre durante a fase de larva, esse estímulo leva o animal a procurar novas fontes de alimento até que o peso crítico

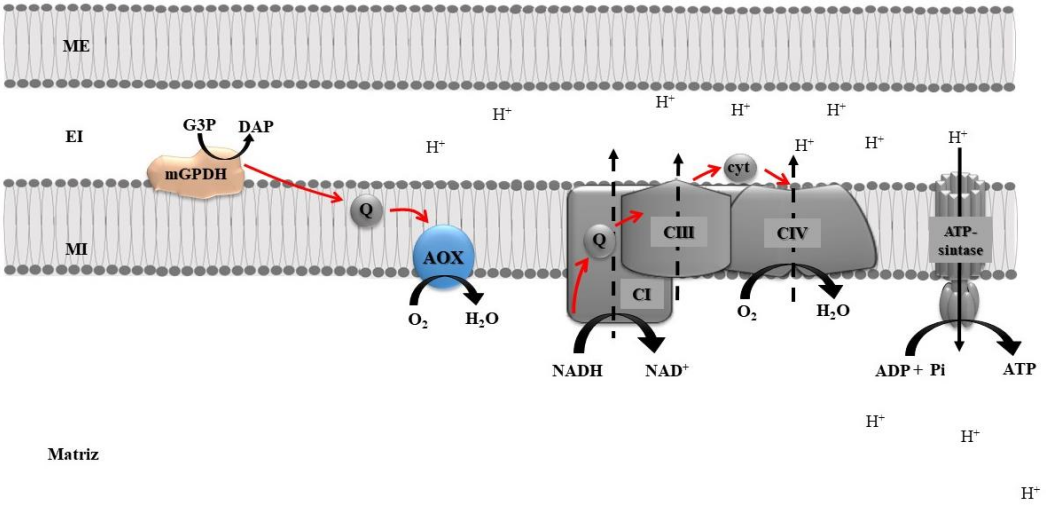
seja atingido, levando à conclusão adequada do desenvolvimento e à transição para a fase de pupa (IKEYA et al., 2002; RULIFSON; KIM; NUSSE, 2002). Alguns sinais hormonais, tais como a diminuição nos níveis de DILPs e do hormônio juvenil, juntamente com o aumento do hormônio ecdisona, induzem a larva a interromper sua alimentação e procurar um local apropriado para a pupação. Nesse estágio, ocorre uma notável redução das enzimas glicolíticas e de outras envolvidas no catabolismo da glicose, incluindo a LDH. Essa condição está possivelmente relacionada ao controle da degradação dos tecidos larvais (GILLETTE; TENNESSEN; REIS, 2021; LI et al., 2017).

Originalmente identificada em tecidos vegetais, mas também encontrada em fungos e em alguns animais, a enzima AOX possui a capacidade de oxidar o ubiquinol em ubiquinona, enquanto simultaneamente reduz o oxigênio em água. Apesar de ter função análoga aos CIII e CIV mantendo o fluxo de elétrons em curso e reduzindo o O_2, a ação da AOX não está associada à criação do gradiente de prótons. Esse mecanismo resulta no desacoplamento mitocondrial, onde a energia é dissipada como calor, sem haver a produção de ATP (HERNANSANZ-AGUSTÍN; ENRÍQUEZ, 2023; JARMUSZKIEWICZ et al., 2001). No entanto, é importante ressaltar que AOX pode coexistir com o CIII sem comprometer significativamente a canalização de substrato entre CI e CIII. Quando AOX é expressa, não há alteração substancial na taxa de OXPHOS, sugerindo, portanto, que a AOX não participa de uma competição expressiva pelo ubiquinol em relação ao CIII (HERNANSANZ-AGUSTÍN; ENRÍQUEZ, 2023). Apesar disso, nosso grupo mostrou uma reconfiguração da respiração, de acordo com a desidrogenase avaliada, sugerindo que pode haver uma interação funcional entre AOX e desidrogenases específicas. Por exemplo, nós mostramos que a respiração mitocondrial em larvas de *Drosophila* mantidas por mGPDH na presença de AOX é muito mais ineficiente indicando desacoplamento. Interessantemente, esta enzima não forma SC, o que indicaria uma maior preferência da AOX em interagir com essas vias paralelas de transferência de elétrons (Figura 14A). Nas pupas AOX, os dados proteômicos revelaram que as enzimas envolvidas na β-oxidação, no ciclo do TCA e na degradação de corpos cetônicos estão consideravelmente mais elevadas. Especulamos que neste contexto, essa interação preferencial também possa acontecer com a ETF:QO, principal doadora de elétrons para a CR a partir do catablismo de ácidos graxos (Figura 14B). Isso pode acelerar a β-oxidação sem

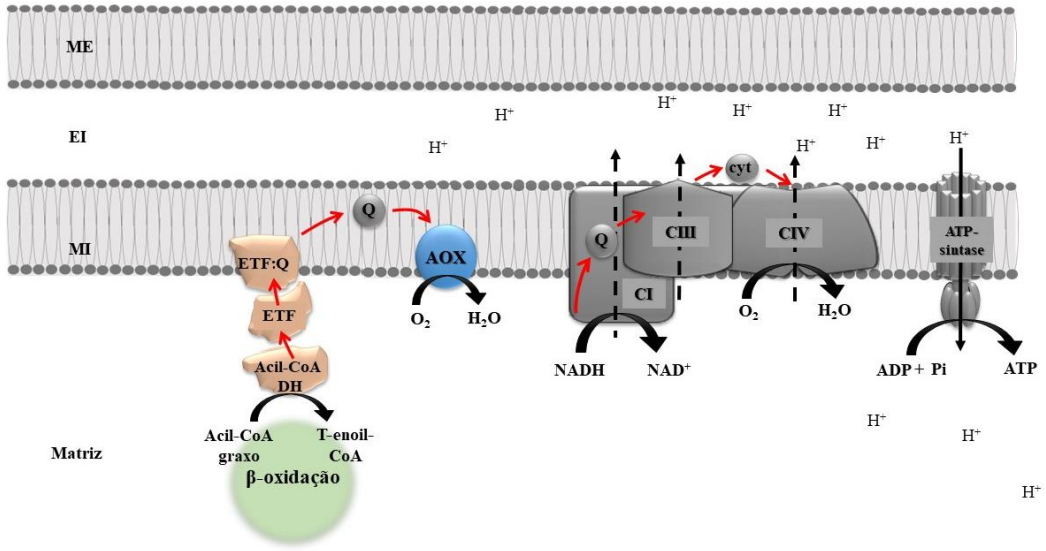
conservação da energia da quebra dos ácidos graxos, com possível detrimento do peso corpóreo animal.

Figura 14 – Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial com vias paralelas para o de fluxo de elétrons na presença de AOX. Setas vermelhas indicam a direção da transferência de elétrons. Setas pontilhadas indicam bombeamento de prótons para EI. CI, CIII e CIV, complexos I, III e IV formando supercomplexo; Q, coenzima Q; AOX, oxidase alternativa; cyt, citocromo c; MI, membrana interna; EI, espaço intermembranar, ME, membrana externa. Preferência de interação da AOX por mGPDH (**A**); Preferência de interação da AOX por ETF:QO (**B**).

A



B



Crédito da Figura: Geovana S. Garcia

Dessa forma, procedemos à análise da massa corporal dos indivíduos e não foi observada variação significativa na massa fresca e seca dos indivíduos analisados, exceto para os indivíduos que expressam AOX em LN (LN-AOX), cuja massa corporal fresca e seca foi menor desde o estágio de L3 errante até o 4º dia de pupa.

Uma vez que a proteômica indica um aumento nas vias de catabolismo de ácidos graxos, investigamos a quantidade de gordura relativa desses indivíduos e observamos que moscas que expressam AOX em SD demonstraram ter uma maior quantidade de gordura nos estágios de L3 e 1P, mantendo essa quantidade constante até 3P, porém com uma queda significativa em 4P. Por outro lado, os indivíduos controle em SD tiveram uma diminuição significativa na quantidade de gordura relativa apenas no estágio 4P, enquanto os controles em LN exibiram uma redução progressiva desde 1P, culminando em uma redução de quase 50% do estágio L3 até 4P. Curiosamente, os indivíduos com expressão de AOX em LN mantiveram a quantidade de gordura corporal relativa constante do estágio L3 até 4P. Embora não fosse possível observar através do ganho de peso o fato de larvas AOX comerem mais (CAMARGO et al., 2021), a quantidade de gordura relativa nos mostra que esses indivíduos armazenam mais gordura. Nesse contexto, é plausível que a taxa de lipólise esteja superando a β-oxidação, e, como estratégia para evitar que ácidos graxos fiquem circulantes na hemolinfa do animal, é possível que esses sejam reesterificados e armazenados novamente.

A degradação de ácidos graxos normalmente ocorre para que ATP seja produzido. No entanto, o desacoplamento mitocondrial causado pelo funcionamento da AOX reduz a eficiência na geração de ATP. Adicionalmente, os dados proteômicos também revelam um aumento significativo nas subunidades da ATP-sintase e da ANT (adenina nucleotídeo translocase), enzimas que, respectivamente sintetiza ATP e o transporta para fora da mitocôndria, enquanto importa o ADP (ZHANG et al., 1999). Essa aparente dualidade nos faz questionar como o funcionamento da AOX estaria associado ao aumento da ATP-sintase e da ANT. Este é um ponto crucial que necessita de uma abordagem mais detalhada, uma vez que aparentemente contrapõe as expectativas. Uma hipótese plausível é que a célula esteja intensificando a síntese de ATP na tentativa de compensar a redução na eficiência energética provocada pelo desacoplamento da AOX.

Os dados obtidos sugerem fortemente que a AOX induz uma intensificada utilização de lipídeos durante a fase de pupa, possivelmente esgotando os nutrientes armazenados durante a fase larval em condições de cultivo em LN. O aumento da atividade metabólica lipídica aliado à privação nutricional pode levar a um desequilíbrio energético, onde a demanda por energia supera a disponibilidade de nutrientes. Tal desequilíbrio pode comprometer a formação adequada de tecidos e órgãos durante a metamorfose. Nesse contexto, o aumento da Dilp8 é de grande importância, visto que este aumento leva a inibição da produção do hormônio ecdisona, atrasando o desenvolvimento de outros tecidos e atuando como um sinal de coordenação de crescimento (ANDERSEN; COLOMBANI; LÉOPOLD, 2012). Os dados obtidos sugerem que a expressão de AOX em condições de restrição alimentar, como é o caso de nossa dieta LN, provoca a interrupção do desenvolvimento na fase de pupa, o que é sinalizado por fatores que indicam um estado de inanição.

Estudos recentes realizados por nosso grupo, nos quais foi conduzida uma análise transcriptômica desses organismos, mostraram que as moscas LN-AOX apresentam um aumento na expressão de genes relacionados à condição de inanição (*starvation*), entre eles o gene *Tor*, o gene *foxo*, as *Dilps 3* e *8*, assim como os genes *InR* e *Idgf5* (fator de crescimento do disco imaginal 5) (CAMARGO et al., 2021). O gene *Tor* atua como um marcador de restrição nutricional e é transcricionalmente ativado para estimular mecanismos que induzem o processo de lipólise (BJEDOV et al., 2010) e sua ativação no tecido adiposo é mediada pela Dilp3 por meio da trealose circulante (KIM; NEUFELD, 2015). Ainda em situações de jejum, quando a sinalização da insulina é reduzida, os fatores de transcrição Foxo migram para o núcleo, regulando programas de transcrição específicos nos tecidos. Esses programas são cruciais para a sobrevivência celular, crescimento e metabolismo, incluindo o metabolismo lipídico. Essa ação resulta na ativação de lipases e na degradação enzimática dos triacilgliceróis no corpo gorduroso de *Drosophila*. Consequentemente, a lipólise é amplificada, liberando ácidos graxos na hemolinfa, disponibilizando-os como fonte de energia durante a restrição alimentar (HEIER; KÜHNLEIN, 2018). Além disso, o corpo gorduroso desempenha um papel crucial na regulação do crescimento, iniciando rapidamente o processo de autofagia como uma estratégia para garantir níveis suficientes de aminoácidos na circulação (LANET; MAURANGE, 2014). Esse

processo também leva à liberação de lipídios, possivelmente direcionados para a síntese de ATP por meio da β-oxidação.

Uma vez que os triglicerídeos também são convertidos em ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia longa que desempenham um papel na proteção do adulto contra ressecamento e desidratação (STORELLI et al., 2019), nós analisamos o nível de hidratação dos animais a partir da subtração do valor de massa seca pela massa fresca. A partir disso, podemos notar que moscas LN-AOX possuem menor hidratação ao longo do período de desenvolvimento analisado, enquanto as demais condições mantém o padrão e a quantidade de hidratação. Essa desidratação acentuada pode ter uma correlação com a deficiência na mobilização de nutrientes, indicando que o aumento do catabolismo de lipídeos pela AOX pode estar levando a um desequilíbrio entre os lipídeos que são direcionados para a síntese de ATP e aqueles direcionados para a impermeabilização do animal.

Os resultados apresentados contribuem significativamente para a compreensão do papel desempenhado pela AOX em resposta ao estresse nutricional em *D. melanogaster*. A identificação da AOX como um fator associado à letalidade durante a restrição nutricional destaca a importância de conduzir investigações adicionais nas vias de sinalização e regulação envolvidas nesse processo. Para uma abordagem mais abrangente, sugerimos que estudos futuros considerem a quantificação de ATP que pode fornecer insights sobre as mudanças energéticas induzidas pela AOX. Além disso, a realização de ensaios de respirometria permitiria avaliar o impacto da AOX no consumo de oxigênio e nas vias preferenciais para o transporte de elétrons. A quantificação das mitocôndrias contribuiria para uma compreensão mais profunda da dinâmica mitocondrial sob a influência da AOX. Uma vez que a quantidade mais elevada na massa mitocondrial poderia remeter a uma tentativa do organismo a contornar o déficit energético que o desacoplamento pelo funcionamento da AOX causa. Finalmente, o uso de linhagens com enzimas chave no catabolismo de lipídeos em estado de knockdown, possibilitaria investigar mais a fundo as interações metabólicas. Tais abordagens mais abrangentes enriqueceriam nossa compreensão das complexas interações metabólicas envolvidas e proporcionariam *insights* mais aprofundados sobre os mecanismos subjacentes à resposta nutricional mediada por essa enzima alternativa.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D. S.; COLOMBANI, J.; LÉOPOLD, P. Drosophila growth and development: Keeping things in proportion. **Cell Cycle**, v. 11, n. 16, p. 2971–2972, 15 ago. 2012.

BEUMER, K. J.; CARROLL, D. Targeted genome engineering techniques in Drosophila. **Methods**, Drosophila developmental biology methods. v. 68, n. 1, p. 29–37, 15 jun. 2014.

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

BJEDOV, I. et al. Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly Drosophila melanogaster. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 35–46, jan. 2010.

BRAND, A. H.; DORMAND, E.-L. The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the Drosophila nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 5, p. 572–578, 1 out. 1995.

CAMARGO, A. F. et al. **Systemic impact of the expression of the mitochondrial alternative oxidase on *Drosophila* development**. [s.l.] Biochemistry, 24 set. 2021. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.09.24.461559>. Acesso em: 23 fev. 2023.

CARVALHO, P. C. et al. PatternLab: From Mass Spectra to Label-Free Differential Shotgun Proteomics. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 40, n. 1, dez. 2012.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, jan. 2016.

CHAN, D. C. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 1, p. 235–259, 2020.

CHATTERJEE, N.; PERRIMON, N. What fuels the fly: Energy metabolism in Drosophila and its application to the study of obesity and diabetes. **Science Advances**, v. 7, n. 24, p. eabg4336, 9 jun. 2021.

CHEN, Y.; ZHOU, Z.; MIN, W. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.

CORMIER, R. P. J. et al. Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in Drosophila melanogaster. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4531, 14 mar. 2019.

CRUZ-BERMÚDEZ, A. et al. Spotlight on the relevance of mtDNA in cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 19, n. 4, p. 409–418, 1 abr. 2017.

DASSA, E. P. et al. The alternative oxidase, a tool for compensating cytochrome *c* oxidase deficiency in human cells. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 4, p. 427–434, dez. 2009.

DE HOON, M. J. L. et al. Open source clustering software. **Bioinformatics**, v. 20, n. 9, p. 1453–1454, 12 jun. 2004.

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-HATTAB, A. W. et al. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 4, p. 315–321, 1 dez. 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. Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 2243–2249, 2014.

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.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **PROTEOMICS**, v. 13, n. 1, p. 22–24, jan. 2013.

FENTON, A. R.; JONGENS, T. A.; HOLZBAUR, E. L. F. Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. **Current Opinion in Cell Biology**, Cell Architecture. v. 68, p. 28–36, 1 fev. 2021.

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.

FERNÁNDEZ-MORENO, M. A. et al. Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 372, p. 33–49, 2007.

FLATT, T. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 214, n. 1, p. 3–48, 1 jan. 2020.

FRANSEN, M.; LISMONT, C.; WALTON, P. The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1126, jun. 2017.

FRIGO, E. et al. The Haves and Have-Nots: The Mitochondrial Permeability Transition Pore across Species. **Cells**, v. 12, n. 10, p. 1409, jan. 2023.

GILLETTE, C. M.; TENNESSEN, J. M.; REIS, T. Balancing energy expenditure and storage with growth and biosynthesis during Drosophila development. **Developmental Biology**, v. 475, p. 234–244, 1 jul. 2021.

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

GOLIC, M. M. et al. FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in Drosophila chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 18, p. 3665–3671, 1997.

GREAVES, L. C.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **IUBMB Life**, v. 58, n. 3, p. 143–151, 2006.

GROTH, A. C.; CALOS, M. P. Phage Integrases: Biology and Applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 3, p. 667–678, 16 jan. 2004.

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, mar. 2006.

HALES, K. G. et al. Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. **Genetics**, v. 201, n. 3, p. 815–842, 1 nov. 2015.

HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol Metabolism in Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 210, n. 4, p. 1163–1184, 1 dez. 2018.

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, 1 jan. 2023.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, jan. 2009.

HUMPHREY, D. M. et al. Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in Drosophila. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 12, p. 2698–2712, 15 jun. 2012.

IKEYA, T. et al. Nutrient-Dependent Expression of Insulin-like Peptides from Neuroendocrine Cells in the CNS Contributes to Growth Regulation in Drosophila. **Current Biology**, v. 12, n. 15, p. 1293–1300, 6 ago. 2002.

JARMUSZKIEWICZ, W. et al. Alternative Oxidase and Uncoupling Protein: Thermogenesis Versus Cell Energy Balance. **Bioscience Reports**, v. 21, n. 2, p. 213–222, 1 abr. 2001.

JUDGE, A.; DODD, M. S. Metabolism. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 607–647, 24 ago. 2020.

KADENBACH, B. Complex IV – The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Mitochondrion**, v. 58, p. 296–302, 1 maio 2021.

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.

KERSCHER, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1459, n. 2, p. 274–283, 15 ago. 2000.

KIM, J.; NEUFELD, T. P. Dietary sugar promotes systemic TOR activation in Drosophila through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6846, 17 abr. 2015.

KOPINSKI, P. K. et al. Mitochondrial DNA variation and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 7, p. 431–445, jul. 2021.

KÜHNLEIN, R. P. Lipid droplet-based storage fat metabolism in Drosophila: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 8, p. 1430–1436, 1 ago. 2012.

LANET, E.; MAURANGE, C. Building a brain under nutritional restriction: insights on sparing and plasticity from Drosophila studies. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 26 mar. 2014.

LEHMANN, M. Endocrine and physiological regulation of neutral fat storage in Drosophila. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 165–177, 5 fev. 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th ed ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

LI, H. et al. Drosophila larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. 1353–1358, 7 fev. 2017.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 102, 3 jan. 2020.

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.

MCFARLAND, R.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 113–155, 2007.

MCINERNEY, J. O.; O'CONNELL, M. J.; PISANI, D. The hybrid nature of the Eukaryota and a consilient view of life on Earth. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 449–455, jun. 2014.

MEYER, J. N.; LEUTHNER, T. C.; LUZ, A. L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. **Toxicology**, Mitochondrial Toxicity. v. 391, p. 42–53, 1 nov. 2017.

MIRZOYAN, Z. et al. Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 10, p. 634–646, out. 2014.

MUNNICH, A.; RUSTIN, P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. **American Journal of Medical Genetics**, v. 106, n. 1, p. 4–17, 2001.

NI, H.-M.; WILLIAMS, J. A.; DING, W.-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. **Redox Biology**, v. 4, p. 6–13, 1 abr. 2015.

NIJHOUT, H. F.; WILLIAMS, C. M. Control of Moulting and Metamorphosis in the Tobacco Hornworm, Manduca Sexta (L.): Cessation of Juvenile Hormone Secretion as a Trigger for Pupation. **Journal of Experimental Biology**, v. 61, n. 2, p. 493–501, 1 out. 1974.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In Sickness and in Health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145–1159, 2012.

OGIENKO, A. A. et al. Drosophila as a Model Organism to Study Basic Mechanisms of Longevity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11244, jan. 2022.

OWEN, O. E.; KALHAN, S. C.; HANSON, R. W. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30409–30412, 23 ago. 2002.

PAOLETTI, A. C. et al. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 18928–18933, 12 dez. 2006.

PENNISI, R. et al. Molecular Evolution of Alternative Oxidase Proteins: A Phylogenetic and Structure Modeling Approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 82, n. 4, p. 207–218, 1 maio 2016.

PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 267–284, maio 2019.

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

RIDDIFORD, L. M. et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from Manduca sexta and Drosophila melanogaster.

Insect Biochemistry and Molecular Biology, Tribute to Lawrence Gilbert. v. 33, n. 12, p. 1327–1338, 1 dez. 2003.

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.

RULIFSON, E. J.; KIM, S. K.; NUSSE, R. Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1118–1120, 10 maio 2002.

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

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, dez. 2017.

SAARI, S. et al. Alternative respiratory chain enzymes: Therapeutic potential and possible pitfalls. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 4, p. 854–866, 1 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, jul. 2019b.

SALDANHA, A. J. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3246–3248, 22 nov. 2004.

SHERMAN, B. T. et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W216–W221, 5 jul. 2022.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, dez. 2006.

STORELLI, G. et al. Drosophila HNF4 Directs a Switch in Lipid Metabolism that Supports the Transition to Adulthood. **Developmental Cell**, v. 48, n. 2, p. 200-214.e6, jan. 2019.

SZIBOR, M. et al. Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **Disease Models & Mechanisms**, p. dmm.027839, 1 jan. 2016.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2017/summary/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731–740, set. 2016.

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**, p. dmm.016527, 1 jan. 2014.

VERCELLINO, I.; SAZANOV, L. A. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 141–161, fev. 2022.

VISCOMI, C. et al. Xenotopic expression of alternative oxidase (AOX) to study mechanisms of mitochondrial disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1864, n. 2, p. 148947, abr. 2023.

WALKER, B. R.; MORAES, C. T. Nuclear-Mitochondrial Interactions. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 427, mar. 2022.

WATMOUGH, N. J.; FRERMAN, F. E. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Quinone Binding and Catalysis. v. 1797, n. 12, p. 1910–1916, 1 dez. 2010.

YAMANAKA, N.; REWITZ, K. F.; O'CONNOR, M. B. Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from Drosophila Research. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 497–516, 2013.

ZHANG, Y. Q. et al. stress sensitive B Encodes an Adenine Nucleotide Translocase in Drosophila melanogaster. **Genetics**, v. 153, n. 2, p. 891–903, 1 out. 1999.