



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

Geovana Siqueira Garcia

**A oxidase alternativa reconfigura o sistema de transferência de elétrons mitocondrial promovendo termogênese e aumento de biomassa em larvas de *Drosophila***

São José do Rio Preto  
2023

Geovana Siqueira Garcia

**A oxidase alternativa reconfigura o sistema de transferência de elétrons mitocondrial promovendo termogênese e aumento de biomassa em larvas de *Drosophila***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora 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: CNPq – Proc. 141001/2019-4

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto  
2023

G216o	<p>Garcia, Geovana Siqueira</p> <p>A oxidase alternativa reconfigura o sistema de transferência de elétrons mitocondrial promovendo termogênese e aumento de biomassa em larvas de Drosophila / Geovana Siqueira Garcia. -- São José do Rio Preto, 2023</p> <p>104 p. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Marcos Túlio Oliveira</p> <p>1. Oxidase alternativa. 2. Mitocôndria. 3. Sistema de transferência de elétrons.. 4. Termogênese. 5. Metabolismo larval.. I. Título.</p>
-------	---

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

**A oxidase alternativa reconfigura o sistema de transferência de elétrons mitocondrial promovendo termogênese e aumento de biomassa em larvas de *Drosophila***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora 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: CNPq – Proc. 141001/2019-4

Comissão Examinadora

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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Monesi  
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti  
UFSCar – Câmpus de São Carlos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Coletto Morales  
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi  
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal  
07 de dezembro de 2023

Aos meus pais, que confiaram na minha escolha profissional e ofereceram um suporte incondicional para que eu alcançasse esse título.

## AGRADECIMENTOS

À força Divina que, de acordo com minha fé, me proporciona força, capacidade e resiliência, me destinando até aqui, o que me incentiva a expressar minha profunda gratidão.

À minha família por ser meu reduto nos dias mais difíceis, minha visão quando todos, mesmo tendo olhos, não veem (como ensina José Saramago), e fonte de motivação. Especialmente, aos meus pais Lusineide e Edson, os quais me ofereceram suporte para que eu estudasse e alcançasse os horizontes que deles lhes foram desviados. Agradeço pela base sólida de valores, pela liberdade de escolha e pela confiança no meu potencial. À minha irmã Luana por me incentivar a cursar Ciências Biológicas na universidade pública, e sempre me estimular com sua euforia, exprimindo um orgulho do qual eu não seria digna. Ao meu irmão Felipe que, desde criança, me inspira demasiadamente com sua disciplina, agradeço por me oferecer um cuidado ímpar, acalantar meus sonhos, e compartilhar pensamentos complexos, com um humor único, que só nós entendemos. O seu constante interesse pelo meu trabalho expresso através das inúmeras perguntinhas a respeito das minhas pesquisas foi mais importante para o meu desenvolvimento do que talvez se aparente.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcos Túlio pela oportunidade de ser uma das primeiras alunas do seu laboratório, e assim, basicamente me alfabetizar cientificamente, além de prover todo suporte para que eu ali permanecesse até o presente. Agradeço-o principalmente por confiar no meu trabalho antes que eu mesma, pelo esforço para que eu conseguisse as melhores oportunidades dentro da academia e me tornasse uma cientista. Também sou grata à sua esposa Emily pelo apoio, principalmente pela paciência e presteza para me ajudar com a língua inglesa.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Mitocondrial e agregados, incluindo os que já seguiram novos caminhos, por contribuírem não apenas científica e profissionalmente, mas também por protagonizarem momentos descontraídos, capazes de amenizar o peso que a academia traz consigo mesma. Particularmente, agradeço àqueles que se tornaram amigos, mesmo que alguns estejam já distantes, mas se fazem presente com mensagens carinhosas: Laíssa (Miusa), André (Mela), Ailton (Biro), Helen, Murilo e Carlos.

Sou especialmente grata por ter sido presenteada com a amizade da Marina e da Ana durante a minha longa passagem pelo laboratório, as quais agradeço muito além da parceria na carreira acadêmica, com incontáveis almoços e histórias espetaculares, que renderam praticamente um vocabulário próprio do trio. Essa jornada teria sido insossa sem os nossos casos engraçados e risadas saudáveis que ecoarão para o resto da minha vida em minha mente. Como recompensar a Marina por seu cuidado singular e amor, expresso através dos lanchinhos que ela gentilmente buscava, principalmente em dias de experimentos que se estendiam além do expediente? Outrossim, ela é um rochedo, companhia física ou virtual para quaisquer momentos, incluindo os mais dolorosos, e promotora de diálogos afinados. Como ser justamente grata à Ana por me impulsionar tanto, inclusive a buscar coragem para ir ao estágio no exterior, sempre refletindo sobre a vida e ponderando as tomadas de decisões? É um privilégio seguir a vida sabendo que as tenho comigo.

Ao Departamento de Biotecnologia da FCAV, sede do nosso laboratório, e ao IBILCE, sede do nosso Programa de Pós-Graduação, abrangendo todos os docentes e funcionários em geral, que viabilizaram a construção de uma base teórica sólida e prontamente me auxiliaram sempre que precisei.

À Professora Dra Kênia Bicego por disponibilizar a câmara termográfica em conjunto com sua expertise para ajudar com os experimentos de termogênese ou quaisquer questões relacionadas, com muita humildade e alegria. Agradeço também a Lívia, sua aluna, sempre solícita para contribuir e muito receptiva, e ao seu colaborador Dr. Johannes Lerchner, pelo empenho com os experimentos de calorimetria.

Ao Dr Jason Tennessen, por oferecer sua valiosa colaboração e por me receber em seu laboratório no Departamento de Biologia, Indiana University Blomington (EUA), me fazendo sentir em casa para um produtivo estágio, o qual me permitiu realizar análises de metabolômica, dentre outras, me proporcionando uma experiência incrível. Agradeço imensamente aos membros do seu laboratório, Eric, Shefali e Madhulika, por me acompanharem e prontamente me ajudarem com quaisquer questões, e à Emily por aprender a produzir a comida das minhas moscas e fazê-la durante todo o meu tempo lá.

Eu não poderia deixar de agradecer às cientistas brasileiras em Bloomington, IN, por tornarem minha experiência nos EUA mais alegre e por oferecerem apoio de todas as naturezas antes mesmo de eu chegar lá. Sempre que eu me lembrar dessas mulheres, lembrarei do significado de sororidade.

Agradeço à American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) e à The Company of Biologists por financiarem a minha visita ao laboratório do Dr. Tennessen, por meio dos programas “Promoting Research Opportunities for Latin American Biochemists” e “Travelling Fellowships”, respectivamente, viabilizando a realização de um projeto de pesquisa que agregou a esta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa de doutorado por 4 anos (Processo nº 141001/2019-4) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar o Laboratório de Biologia Mitochondrial sob o processo nº 2021/06711-2.

Muito obrigada aos membros da banca por aceitarem prontamente esta responsabilidade, consumando essa etapa com inestimáveis contribuições científicas.

A todos que contribuíram de quaisquer outras formas, afirmo meu reconhecimento. O meu título é fruto de uma construção diária e coletiva.

*“A capacidade de aprender, não apenas para nos adaptar, mas sobretudo para transformar a realidade, para nela intervir, recriando-a, fala de nossa educabilidade a um nível distinto do nível do adestramento dos outros animais ou do cultivo de plantas.”*

Paulo Freire (2020, p. 67)

## RESUMO

A fosforilação oxidativa (OXPHOS) é um processo mitocondrial chave ao metabolismo celular e a outros processos celulares. É dependente de um sistema que realiza a transdução da energia química estocada nos nutrientes em energia para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), através de diversas vias metabólicas e uma série de reações de transferência de elétrons que utilizam o oxigênio comoceptor final. Dentre os componentes do sistema de transferência de elétrons mitocondrial (ETS), os complexos I, III e IV realizam, além de óxido-redução, bombeamento de prótons da matriz para o espaço inter-membranas, gerando um gradiente de prótons ( $\Delta\text{pH}$ ), utilizado pela ATP-sintase para produção de ATP. A energia não aproveitada para este fim é dissipada como calor metabólico. A oxidase alternativa (AOX) é uma enzima do ETS, encontrada na maioria dos eucariotos, capaz de substituir parcialmente a atividade dos complexos III e IV, sem bombear prótons para o espaço inter-membranas. Vertebrados e insetos perderam o gene que codifica AOX, mas a expressão xenotópica a partir do gene de *Ciona intestinalis* em camundongos, *Drosophila melanogaster* e em outros modelos biológicos, gerou melhorias em condições associadas a disfunções mitocondriais, o que representa um potencial terapêutico para doenças humanas. Mostramos anteriormente que AOX mitiga efeitos do estresse térmico causado pelo frio em *Drosophila*, sob a hipótese de termogênese. Considerando a dinamicidade do ETS em resposta aos nutrientes disponíveis e a outras condições do meio, buscamos avaliar se a AOX atua diferentemente, de acordo com a via que fornece elétrons ao ETS. Neste trabalho descrevemos efeitos bioquímico-metabólicos e fenotípicos acarretados pela expressão xenotópica de AOX em larvas de *D. melanogaster*, principalmente sob temperatura baixa. Associamos efeitos fenotípicos à investigação da fisiologia mitocondrial e do metabolismo intermediário larval. Mostramos que AOX causa um aumento na respiração via complexo I, mas um decréscimo através da glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial, via pela qual AOX mais diminui a eficiência de acoplamento mitocondrial. Essa configuração é termogênica, é correlacionada com diminuição dos níveis de glicerol-3-fosfato e causa cataplerose em larvas, evidenciada pela diminuição dos níveis de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico. Em conjunto, essas alterações são funcionalmente importantes para o crescimento, acúmulo de biomassa principalmente no frio, o que leva também ao aumento da mobilidade. Uma vez que

os tecidos larvais são altamente proliferativos, muitas vezes comparados a tumores de mamíferos do ponto de vista metabólico, discutimos os impactos da AOX nesse contexto e reforçamos a necessidade de cautela para a sua aplicação terapêutica.

**Palavras-chave:** Mitocôndria. AOX. Metabolismo larval. Controle respiratório.

## ABSTRACT

Oxidative phosphorylation (OXPHOS) is a key mitochondrial process in cellular metabolism and other cellular activities. It relies on a system that converts the chemical energy stored in nutrients to energy for the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) through various metabolic pathways and a sequence of electron transfer reactions which lead the oxygen reduction to water. Among the mitochondrial electron transfer system (ETS), the complexes I, III, and IV not only perform oxidation-reduction but also pump protons from the matrix to the inter-membrane space. This action generates a proton gradient utilized by ATP synthase to produce ATP, while any energy not used for this purpose is dissipated as metabolic heat. Alternative oxidase (AOX), an ETS enzyme found in most eukaryotes, can bypass complex III and IV activities, but without pumping protons into the inter-membrane space. Vertebrates and insects have lost the gene encoding AOX, but xenotopic expression of the *Ciona intestinalis* gene in mice, *Drosophila melanogaster* and other biological models has shown improvements in conditions associated with mitochondrial dysfunction, presenting therapeutic potential for human diseases. We previously showed that AOX mitigates effects of effects of cold-induced thermal stress in *Drosophila*, supporting a thermogenesis hypothesis. Considering the dynamic nature of the ETS in response to available nutrients and environmental conditions, we aimed to assess whether AOX functions differently depending on the pathway supplying electrons to the ETS. In this work we describe biochemical-metabolic and phenotypic effects caused by the xenotopic expression of AOX in *D. melanogaster* larvae, mainly at low temperatures. We associate phenotypic effects with an exploration of mitochondrial physiology and larval intermediary metabolism. Our findings indicate that AOX increases respiration via complex I but decreases it via mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase, the route through which AOX most significantly reduces mitochondrial coupling efficiency. This configuration exhibits thermogenic properties, is correlated with decreased glycerol-3-phosphate levels, and induces cataplerosis in larvae, as evidenced by lower levels of tricarboxylic acid cycle intermediates. These changes are functionally important for growth and biomass accumulation, especially in cold conditions, leading to increased mobility. Considering the highly proliferative nature of larval tissues, often compared to mammalian tumors metabolically, we discuss the implications of AOX in this context and emphasize the need for caution in its therapeutic application.

Keywords: Mitochondria, AOX, Larval metabolism, Respiratory control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática simplificada do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)	26
Figura 2 – Diagrama simplificado da integração da energia de diferentes vias metabólicas através do ETS mitocondrial	29
Figura 3 – Ciclo de vida simplificado da <i>Drosophila melanogaster</i>	53
Figura 4 – Diferenciação morfológica entre larvas de segundo (L2) e terceiro instar (L3) de <i>Drosophila melanogaster</i>	54
Figura 5 – Termografia de infravermelho mostra diferenças de temperatura corpórea entre as larvas controle e AOX	63
Figura 6 – Atividade larval medida através de diferentes abordagens em larvas controle e AOX	64
Figura 7 – Avaliação da biomassa de larvas L3 errantes desenvolvidas a 25 e a 12 °C	66
Figura 8 – Tamanho de larvas desenvolvidas a 25 e a 12 °C e estimativa da ingestão alimentar	67
Figura 9 – Taxas de consumo de oxigênio mitocondrial larval na presença de AOX a 25 °C e a 12 °C mantidas pelas desidrogenases indicadas	69
Figura 10 – Taxas de controle respiratório mitocondrial são alteradas pela AOX	73
Figura 11 – Análise metabolômica em L3 errantes cultivadas a 25 °C mostra diferenças causadas pela AOX	75
Figura 12 – Análise metabolômica em L2 cultivadas a 25 °C aponta diferenças causadas pela AOX em diferentes níveis	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2-HG</b>	2-Hidroxiglutarato
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	$\alpha$ -cetoglutarato
<b>ANDH</b>	NADH desidrogenases alternativas
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANT</b>	Translocases de nucleotídeos de adenina
<b>AOX</b>	Oxidase alternativa
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>CCCP</b>	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
<b>CI</b>	Complexo I
<b>CII</b>	Complexo II
<b>CIII</b>	Complexo III
<b>CIV</b>	Complexo IV
<b>COX</b>	Citocromo c oxidase
<b>COX1</b>	Subunidade 1 do citocromo c oxidase
<b>COX2</b>	Subunidade 2 do citocromo c oxidase
<b>COX3</b>	Subunidade 3 do citocromo c oxidase
<b>cGPDH</b>	Glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica
<b>CoA-SH</b>	Coenzima A
<b>CoQ</b>	Coenzima(s) Q
<b>CoQH</b>	Coenzima(s) Q semi-reduzida(s)
<b>CoQH<sub>2</sub></b>	Coenzima(s) Q reduzida(s)
<b>dERR</b>	Receptor relacionado ao estrogênio de <i>Drosophila</i>

<b>DHAP</b>	di-hidroxiacetona-fosfato
<b>DHODH</b>	di-hidroorotato desidrogenase
<b>DMGDH</b>	dimetilglicina desidrogenase
<b><i>DmDG</i></b>	Gene codificador da proteína distroglicana de <i>Drosophila</i>
<b>DRP-1</b>	Dynammin-related protein – dinamina relacionada à fissão mitocondrial
<b>EA</b>	Enzima(s) alternativa(s)
<b>EGTA</b>	Ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
<b>EIM</b>	Espaço intermembranas da mitocôndria
<b>ETF-QO</b>	flavoproteína de transferência de elétrons: ubiquinona oxidoreductase
<b>ERR- <math>\alpha</math></b>	Receptor relacionado ao estrogênio
<b>ETS</b>	Sistema de transferência de elétrons
<b>FADH</b>	Dinucleotídeo de flavina-adenina
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleotídeo de flavina-adenina reduzido
<b>FILA</b>	Acidose láctica infantil
<b>fzo</b>	Gene “fuzzy onions”, codificador da mitofusina denominada FZO
<b>G3P</b>	Glicerol 3-fosfato
<b><i>GPO1</i></b>	Gene codificador da isoforma 1 da glicerol-3-fosfato-desidrogenase mitocondrial
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>GTPase</b>	Hidrolase de GTP
<b>IF1</b>	Fator 1 inibitório de ATPase
<b>L1</b>	Larvas de primeiro instar
<b>L2</b>	Larvas de segundo instar
<b>L3</b>	Larvas de terceiro instar
<b>LS</b>	Síndrome de Leigh
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo

<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MEM</b>	Membrana externa mitocondrial
<b>MFN1</b>	Mitofusina 1
<b>MFN2</b>	Mitofusina 2
<b>MIM</b>	Membrana interna mitocondrial
<b>MOX</b>	O-metoxilamina
<b>mGPDH</b>	Glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
<b>NADH</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NRF-1</b>	Fator nuclear respiratório 1
<b>NRF-2</b>	Fator nuclear respiratório 2
<b>OPA1</b>	Optic atrophy 1, mitofusina atuante na MIM
<b>OXPHOS</b>	Fosforilação oxidativa
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PGC – 1</b>	A família de proteínas coativadoras - 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama-1
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Proteína coativadora 1 $\alpha$ do receptor ativado por proliferador de peroxissomo
<b>ProDH</b>	Prolina desidrogenase
<b>PTP</b>	Permeability transition pore
<b>Q<sub>i</sub></b>	Sítio quinona-redutase
<b>Q<sub>o</sub></b>	Sítio quinol-oxidase

<b>RET</b>	Transporte reverso de elétrons
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SarDH</b>	Sarcosina desidrogenase
<b>SDH</b>	Succinato desidrogenase
<b>SDHA</b>	Subunidade A da succinato desidrogenase
<b>SDHB</b>	Subunidade B da succinato desidrogenase
<b>SDHC</b>	Subunidade C da succinato desidrogenase
<b>SDHD</b>	Subunidade D da succinato desidrogenase
<b>SC</b>	Supercomplexos
<b>TACO 1</b>	Ativador translacional do citocromo c oxidase 1
<b>TCA</b>	Ciclo do ácido tricarboxílico
<b>TFAM</b>	Fator de transcrição mitocondrial A
<b>TRP</b>	Canais iônicos receptores de potencial transitório
<b>TRIS-HCL</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano)-HCL
<b>UCP</b>	Proteína desacopladora

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>°C</b>	Grau celsius
<b>Ca<sup>+</sup></b>	Cálcio
<b>Fe</b>	Ferro
<b>S</b>	Enxofre
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>mV</b>	Milivolts
<b>Cu</b>	Cobre
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	Medida de afinidade da enzima pelo substrato, o quanto menor o <i>K<sub>m</sub></i> , maior é a afinidade
<b>%</b>	Porcentagem
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>h</b>	Hora(s)
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>mm</b>	Milímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>ml</b>	Mililitro
<b>g</b>	Gramma
<b>~</b>	Aproximadamente
<b>mM</b>	Milimolar
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>p/p</b>	Peso por peso
<b>μl</b>	Microlitro
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotássico
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>rpm</b>	Rotações por minuto

<b>M</b>	Molar
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>μM</b>	Micromolar
<b>P</b>	Estado mitocondrial de OXPHOS
<b>L</b>	Estado mitocondrial de Leak
<b>E</b>	Estado mitocondrial de ET-capacity (capacidade máxima de transferência de elétrons)
<b>rcf</b>	Força centrífuga relativa
<b>X</b>	Veze
<b>+PG</b>	Adição de propilgalato
<b>+AA</b>	Adição de antimicina A

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Mitocôndria</b> .....	19
3.1.1	Origem e estrutura .....	19
3.1.2	Biogênese e dinâmica mitocondrial .....	20
<b>3.2</b>	<b>Metabolismo mitocondrial</b> .....	23
3.2.1	Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) .....	24
3.2.2	Fosforilação oxidativa .....	27
3.2.3	Componentes do ETS clássico: estruturas e funções .....	30
3.2.3.1	CI, CIII e CIV .....	30
3.2.3.2	CII, mGPDH e outras desidrogenases associadas a FAD .....	32
3.2.4	ATP-Sintase .....	37
3.2.5	Enzimas alternativas (EA) .....	38
3.2.5.1	Oxidase alternativa (AOX) e sua abordagem terapêutica .....	41
3.2.6	Dinamicidade do ETS: interações e formação de supercomplexos .....	45
<b>3.3</b>	<b>A influência da temperatura e termorregulação em animais</b> .....	47
3.3.1	Produção de calor nos organismos .....	49
<b>3.4</b>	<b>Uso de <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo-modelo</b> .....	52
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
<b>4.1</b>	<b>Linhagens e cultivo</b> .....	56
<b>4.2</b>	<b>Mensuração da temperatura corpórea</b> .....	56
<b>4.3</b>	<b>Atividade e mobilidade larval</b> .....	57
<b>4.4</b>	<b>Avaliações de biomassa e teor de gorduras e proteínas totais</b> .....	58
<b>4.5</b>	<b>Tamanho larval</b> .....	59
<b>4.6</b>	<b>Ingestão alimentar</b> .....	59
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da fisiologia mitocondrial</b> .....	60
<b>4.8</b>	<b>Análise de metabolômica baseada em espectrometria de massas por cromatografia gasosa</b> .....	61
<b>4.9</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	62
<b>5.1</b>	<b>A temperatura larval é elevada na presença da AOX</b> .....	62
<b>5.2</b>	<b>AOX contribui para o acúmulo de biomassa e crescimento larval</b> .....	65
<b>5.3</b>	<b>A expressão de AOX reconfigura o ETS mitocondrial de larvas</b> .....	67
<b>5.4</b>	<b>AOX eleva a respiração Leak das mitocôndrias larvais</b> .....	71

<b>5.5</b>	<b>A eficiência da OXPPOS é significativamente diminuída na presença de AOX, principalmente via mGPDH.....</b>	<b>71</b>
<b>5.6</b>	<b>AOX altera significativamente os níveis de metabólitos intermediários em larvas.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que ajudam a célula a se ajustar às suas necessidades metabólicas em resposta a fatores diversos, tais como temperatura, disponibilidade de oxigênio e/ou nutrientes, entre outros (CORMIER et al., 2019; EFEYAN; COMB; SABATINI, 2015; SCOTT et al., 2019; SOKOLOVA, 2018). O estudo de sua fisiologia constitui a base para a compreensão de condições que conferem adaptações aos organismos, assim como de diversas patologias (HERST et al., 2017; SOKOLOVA, 2018; ZHANG et al., 2015; ZOROVA et al., 2018). As funções mitocondriais são variadas, mas em sua maioria decorrem do processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), o qual integra a transdução da energia química estocada em nutrientes através de várias vias metabólicas com um sistema de transferência de elétrons mitocondrial (ETS) para a produção da maior parte do ATP em eucariotos. Diversas desidrogenases inseridas na membrana interna da mitocôndria (MIM) compõem o ETS, como NADH desidrogenase (complexo I, CI), succinato desidrogenase (complexo II, CII) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (mGPDH), as quais catalisam a reoxidação de carreadores de elétrons ou outros metabólitos intermediários e convergentemente reduzem moléculas de coenzima-Q (CoQ passam para um estado reduzido,  $\text{CoQH}_2$ ) (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2021; LAROSA; REMACLE, 2018). Reações redox em cadeia realizadas pelo complexo do citocromo *bc1* (complexo III, CIII) e citocromo c oxidase (complexo IV, CIV), por intermédio da molécula de citocromo c, acoplam a reoxidação de  $\text{CoQH}_2$  à redução de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) a água. Concomitantemente, CI, CIII e CIV bombeiam prótons para o espaço intermembranas (EIM), gerando o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e a força próton-motriz utilizada pela ATP-sintase para catalisar a fosforilação do ADP em ATP (LAROSA; REMACLE, 2018; MITCHELL, 1961; ZOROVA et al., 2018).

Notavelmente, a energia potencial não é totalmente transformada em trabalho pela ATP-sintase, uma vez que os prótons podem “vazar” através da MIM, liberando energia como calor (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NICHOLLS, 2021; ZHAO et al., 2019). O vazamento de prótons é ocasionado por condutância basal, que é dependente da composição de ácidos graxos da MIM e da abundância de translocases de adenina (ANTs); e/ou por processos regulados, cujo vazamento é

catalisado por proteínas de desacoplamento (UCPs) (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NICHOLLS, 2021).

O desacoplamento mitocondrial é o principal mecanismo de termogênese independente de tremor, com função fisiológica fundamental à resistência ao frio (CANNON; NEDERGAARD, 2004; MATTHIAS et al., 2000; NEDERGAARD et al., 2001; NICHOLLS, 2021). Por exemplo, o tecido adiposo marrom de mamíferos é rico em mitocôndrias com altos níveis de UCP1, de modo que tais organelas produzem muito mais calor do que ATP (CANNON; NEDERGAARD, 2004; MATTHIAS et al., 2000; NEDERGAARD et al., 2001; PORTER, 2017), sendo de suma importância para o papel que este tecido desempenha em toda fisiologia e metabolismo animal. Por outro lado, disfunções que aumentem o vazamento de prótons em tecidos animais com alta demanda energética, como o nervoso, podem gerar danos relacionados a doenças complexas. (CHENG et al., 2017; GRIFFITHS et al., 2020; RUPPRECHT et al., 2010). Por exemplo, mitocôndrias do prosencéfalo de camundongos, no qual o gene *Fmr1* foi nocauteado, levando à síndrome do X frágil (uma das principais causas genéticas do autismo), têm como característica um aumento do vazamento de prótons durante o pico sinaptogênico, acarretando defeitos no neurodesenvolvimento (GRIFFITHS et al., 2020).

O processo de transferência de elétrons inerente à OXPHOS também gera espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOWALTOWSKI et al., 2009; LAROSA; REMACLE, 2018; ZHAO et al., 2019), as quais são atuantes em processos de sinalização celular e têm importância fisiológica, mas em excesso podem ser prejudiciais, uma condição muito comum em disfunções mitocondriais (RAY; HUANG; TSUJI, 2012; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; SHEN; PERVAIZ, 2009; TRACHOOTHAM et al., 2008). Altos níveis de ROS, geralmente são atrelados a elevado  $\Delta\Psi_m$ , causam aumento no vazamento de prótons, e este por sua vez, tende a ser um mecanismo que amenizam a produção elevada de ROS (CHENG et al., 2017; KOWALTOWSKI et al., 2009). Entretanto, a regulação fina entre esses parâmetros para diferentes tecidos biológicos ainda não é totalmente compreendida. Ressalta-se que nem sempre o aumento do vazamento de prótons causa diminuição na eficiência energética, e sua regulação tem até mesmo sido cogitada como um dos alvos terapêuticos para tratamento de doenças cardiovasculares, por exemplo (CHENG et al., 2017).

A maioria dos procariotos e dos eucariotos, incluindo fungos, protozoários, plantas e vários metazoários (JUSZCZUK; RYCHTER, 2003; MCDONALD; VANLERBERGHE, 2005, 2004b; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009; MOORE et al., 2013; STENMARK; NORDLUND, 2003), possuem também outras classes de enzimas no ETS, as denominadas enzimas alternativas (EA). Dentre essas, a oxidase alternativa (AOX), tem atividade de química redox semelhante a CIII-IV, isto é, oxida  $\text{CoQH}_2$  e reduz o oxigênio à água, porém, sem bombeamento de prótons. Assim, sua ação não contribui à força próton-motriz que leva à produção de ATP (JUSZCZUK; RYCHTER, 2003), dissipando energia também em forma de calor. É via AOX que algumas plantas conseguem gerar calor em órgãos específicos, permitindo o florescimento sob condições gélidas e a volatilização de compostos importantes para atração de polinizadores (INABA et al., 2019; MEEUSE, 1975; WATLING; ROBINSON; SEYMOUR, 2006). Vertebrados e insetos perderam independentemente os genes que codificam AOX ao longo da evolução, assim como outras EA (MCDONALD et al., 2015; MCDONALD; VANLERBERGHE, 2004a; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009). Porém, a ideia de que a introdução da via alternativa de transferência de elétrons conferida pela AOX poderia ajudar em condições de estresse respiratório ou sobrecarga dos CIII e CIV tem sido cogitada como possível tratamento para doenças mitocondriais, especialmente pelo potencial desta enzima em diminuir o excesso de ROS, restabelecendo o consumo de oxigênio em mitocôndrias de pacientes, mesmo que a produção de ATP não seja tão elevada quanto em uma pessoa sem doenças mitocondriais.

Esse conceito tem sido amplamente explorado através da expressão xenotópica do gene da AOX proveniente de *Ciona intestinalis* (Tunicata: Ascidiaceae) em moscas *Drosophila melanogaster* e em outros modelos biológicos (DASSA et al., 2009; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; GIORDANO et al., 2019; HAKKAART et al., 2006; KEMPPAINEN et al., 2014; RAJENDRAN et al., 2019; SZIBOR et al., 2017). Especialmente em *D. melanogaster*, as linhagens que expressam AOX (linhagens AOX) sobrevivem a níveis tóxicos de antimicina A e cianeto de potássio (inibidores dos CIII e CIV, respectivamente) (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009) e têm diversos fenótipos relacionados a deficiências no CIV melhorados significativamente (KEMPPAINEN et al., 2014). Além disso, outras diversas condições patológicas modeladas na mosca são melhoradas na presença da AOX, incluindo Parkinson's (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009) e Alzheimer's (EL-KHOURY et al., 2016) Até

mesmo alguns efeitos inesperados foram mostrados, como a prevenção de disfunções ontogenéticas em *D. melanogaster* (ANDJEIKOVIĆ; KEMPPAINEN; JACOBS, 2016).

Não obstante os resultados promissores, ainda são levantadas questões que demandam um entendimento detalhado da fisiologia mitocondrial na presença da AOX em mamíferos e insetos. Os impactos metabólicos e fisiológicos da expressão de AOX nesses animais com ETS totalmente funcional são praticamente indetectáveis, mas é importante ressaltar que estes são cultivados em condições de laboratório com nutrição rica e abundante e temperaturas favoráveis (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; SZIBOR et al., 2017). É relevante considerarmos também o contexto bioenergético do tecido o qual AOX se insere, a propriedade termogênica inerente à sua atividade e as condições limitantes impostas pelo meio. Sabemos que em camundongos, enquanto um fenótipo de cardiomiopatia letal é resgatado pela AOX (RAJENDRAN et al., 2019), uma miopatia severa em músculo esquelético é agravada por esta enzima (DOGAN et al., 2018). Em *D. melanogaster*, o desenvolvimento de larvas AOX em uma dieta de baixa disponibilidade nutricional leva a letalidade na fase de pupa (SAARI et al., 2019a, 2019b), e mesmo em uma dieta rica em nutrientes, as moscas AOX adultas que emergem apresentam perda de peso precoce (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). Ademais, claramente a AOX mitiga os efeitos do frio, fazendo com que indivíduos adultos se recuperem mais rapidamente da imobilização causada pela exposição ao frio intenso (SAARI et al., 2019b) e com que a viabilidade larval aumente e o desenvolvimento de embrião até pré-pupa seja acelerado em até 10 dias sob a temperatura estressante de 12 °C (SAARI et al., 2019b). Isso aponta para um papel significativo dessa enzima nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Drosophila*, papel este possivelmente relacionado à termogênese, porém os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não foram esclarecidos.

Neste trabalho investigamos efeitos bioquímico-metabólicos acarretados pela expressão constitutiva de AOX em larvas de *D. melanogaster* desenvolvidas em condições térmicas distintas: 25 °C e 12 °C. O estágio larval é caracterizado pelo crescimento rápido, com um acúmulo de biomassa de aproximadamente 200X, desde o embrião até larvas de terceiro instar (L3) errantes, dentro de um período de 4-5 dias a 25 °C, com um perfil metabólico comparável ao de células tumorais (JACOBS; GEORGE; KEMPPAINEN, 2020; TENNESSEN et al., 2014; TENNESSEN; THUMMEL, 2011; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). A hipótese

geral do trabalho é de que AOX desacopla parcialmente as mitocôndrias, sendo capaz de reconfigurar o ETS mitocondrial e gerar calor corpóreo, impactando o organismo. Analisamos fenotipicamente as larvas quanto a mobilidade, tamanho, acúmulo de biomassa, ingesta e temperatura corpórea. Buscamos explicar os efeitos observados através da avaliação da fisiologia mitocondrial, com enfoque em duas diferentes vias do ETS: CI e mGPDH. Por fim, avaliamos como o metabolismo intermediário é impactado pela reconfiguração do ETS causado pela AOX.

## 2 OBJETIVO GERAL

Descrever as alterações fenotípicas e de fisiologia mitocondrial associadas à expressão de AOX em larvas de *D. melanogaster*, com enfoque no potencial termogênico da enzima, avaliando os efeitos sobre o metabolismo proliferativo e crescimento.

### 2.1 Objetivos específicos

- 1) Averiguar as alterações fenotípicas causadas por AOX, especialmente sob condição térmica fria, quantificando com precisão o calor corpóreo, a mobilidade, o tamanho e a massa de larvas;
- 2) Analisar como a fisiologia mitocondrial dessas larvas é alterada na presença de AOX, mensurando a contribuição das principais desidrogenases do ETS para o consumo de oxigênio e controle respiratório;
- 3) Entender como a possível reestruturação do ETS mitocondrial causada pela AOX afeta o metabolismo intermediário larval;

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Mitocôndria

A mitocôndria ficou conhecida primordialmente como a casa de energia das células, devido à transdução da energia química estocada em nutrientes e a consequente produção extensiva da principal molécula energética dos organismos, o ATP, acoplada ao consumo de oxigênio (MACHEREL et al., 2021; SIEKEVITZ, 1957). Porém, o processo que o gera (OXPHOS) atua como um regulador chave do metabolismo e homeostase celular, conforme será descrito posteriormente, o que faz da mitocôndria objeto de estudo nas mais diversas áreas biológicas, inclusive como alvo terapêutico para muitas doenças (MURPHY; HARTLEY, 2018; WILSON, 2017).

Exatamente por ser um centro de produção energética, sendo a maioria das reações que nela ocorrem exergônica, a mitocôndria também já foi chamada de “fornalha microscópica”, uma vez que o subproduto dessas reações é o calor. Um estudo com células humanas em cultura já chegou a apontar que a mitocôndria apresenta uma temperatura interna que ultrapassa 10 °C acima da externa constante de 38 °C (temperatura próxima da fisiológica), em conjunto com dados que mostram que enzimas do ETS tem atividade ótima sob temperatura de aproximadamente 50 °C (CHRÉTIEN et al., 2018). Assim ela exerce função na manutenção da temperatura corpórea e contribui à adaptação de diversos organismos a ambientes frios, mesmo aqueles considerados ectotérmicos (MACHEREL et al., 2021), permitindo até que plantas sejam termogênicas, por exemplo, através de diferentes mecanismos (MEEUSE, 1975; WATLING; ROBINSON; SEYMOUR, 2006).

#### 3.1.1 Origem e estrutura

A estrutura característica, composta por dupla-membrana, assim como a presença de DNA circular próprio (mtDNA), de fita-dupla e com maquinaria de replicação específica, clarificam a teoria mais aceita da origem da mitocôndria por endo-simbiose (FALKENBERG, 2018; PALADE, 1953; ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017). Possivelmente, isso tenha ocorrido a partir de uma bactéria aeróbica que passou a viver em uma célula hospedeira anaeróbica derivada do grupo Archea. Essa bactéria endossimbionte teria incorporado proteínas do hospedeiro e

exógenas, e eventos de transferência lateral de genes contribuíram para a sua adaptação à anaerobiose (KU et al., 2015a, 2015b; ROGER; MUÑOZ-GÓMEZ; KAMIKAWA, 2017). Esse evento propiciou um aumento na magnitude de  $10^4$  a  $10^5$  no rendimento das moléculas de ATP por gene em células eucarióticas. Tal magnitude torna o aumento de aproximadamente 10 vezes no rendimento de produção de ATP por molécula de glicose na respiração aeróbica até insignificante, permitindo-se considerar que a presença da mitocôndria, com a internalização de membranas, foi um advento bioquímico essencial para evolução dos eucariotos e separação destes dos procariotos, e não o oxigênio, como se discutem (KU et al., 2015b).

As membranas mitocondriais, externa (MEM) e interna (MIM), são fundamentais para que a organela desempenhe seus papéis na célula. Elas delimitam o espaço intermembranas (EIM) e se distinguem a nível estrutural e funcional e (HACKENBROCK, 1968; PALADE, 1953). A MEM é mais permeável por ser enriquecida de porinas, permitindo que moléculas de até 5000 daltons 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 MIM é mais impermeável e tem estrutura peculiar, formando invaginações, denominadas cristas, além de regiões adjacentes à MEM. São nas cristas que geralmente encontram-se inseridos os complexos multi-enzimáticos que compõem o ETS. Nas regiões de MIM adjacentes à MEM, concentram-se transportadores e outras enzimas envolvidas no metabolismo mitocondrial (EL-HATTAB et al., 2018; FREYA; MANNELLAB, 2000; PIMENTEL, 2013; WERNER; NEUPERT, 1972). O espaço interno 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 metabólitos resultantes da glicólise, beta-oxidação, vias de metabolização de aminoácidos, e ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) (ALBERTS et al., 2002; PIMENTEL, 2013).

### 3.1.2 Biogênese e dinâmica mitocondrial

Considerada uma organela semiautônoma, a mitocôndria se multiplica a partir de uma pré-existente, herdando seu mtDNA. Entretanto, esse processo, isto é, a biogênese mitocondrial, é dependente do genoma nuclear, ocorrendo de forma orquestrada, através de um processo complexo que combina genes mitocondriais e

nucleares (POPOV, 2020; WESTERMANN, 2010). A família de proteínas denominada PGC-1, principalmente PGC-1 $\alpha$ , tem um papel central na regulação da biogênese mitocondrial, desencadeando a transcrição e tradução do mtDNA (POPOV, 2020; VILLENA, 2015). Uma vez ativada por fosforilação ou desacetilação, fatores nucleares respiratórios (NRF-1 e NRF-2) e o receptor relacionado ao estrogênio (do inglês, ERR- $\alpha$ ) também se tornam ativos, em conjunto com o aumento da expressão do fator de transcrição A (TFAM), que é o principal efetor da replicação e transcrição do mtDNA. Posteriormente, fatores de tradução nucleares entram em ação para atuarem na tradução de genes mitocondriais, e o ativador translacional do citocromo c oxidase 1 (TACO 1), que se liga ao RNA mitocondrial, exerce papel importante na regulação dos níveis de proteínas mitocondriais (POPOV, 2020).

Os genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais são a maioria dentre os progenitores da organela, possivelmente porque os genes mitocondriais foram perdidos ao longo da evolução ou transferidos para os cromossomos da célula hospedeira (KU et al., 2015a; MOULIN; CAUMONT-SARCOS; IEVA, 2019; POPOV, 2020). Assim, a síntese, importação e processamento das proteínas codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) são essenciais para garantir a biogênese mitocondrial. Para isso, pré-proteínas são produzidas no citosol contendo uma sinalização específica, que é um sítio de clivagem amino-terminal, o qual será reconhecido por um complexo de translocases para direcionamento à mitocôndria. Já na matriz, as proteínas são montadas e processadas para atuarem em locais intraespecíficos: a matriz ou a MI. Esse processo requer energia que advém das próprias mitocôndrias através da OXPHOS e do seu  $\Delta\Psi_m$  (MOULIN; CAUMONT-SARCOS; IEVA, 2019; POPOV, 2020)

Apesar da descrição das características estruturais que, simplificada, definem as mitocôndrias com um formato ovalado e espalhadas pelo citosol, sabe-se que elas são dinâmicas e são observadas, muitas vezes, formando uma rede tubular que se conecta através das membranas. Processos de fusão e fissão atuam regulando o dinamismo mitocondrial, unindo e separando as organelas, de acordo com as necessidades e o tipo celular, respondendo a demandas energéticas e a condições de estresse. (TILOKANI et al., 2018; WESTERMANN, 2010). Essas adaptações morfológicas são garantidas principalmente por uma maquinaria proteica composta por GTPases pertencentes à família das dinaminas (do inglês, *dynamin*) com estrutura e domínios conservados entre os grupos de organismos (LIU et al., 2020;

WESTERMANN, 2010). Notavelmente, estudos com *D. melanogaster* levaram à primeira identificação de um mediador da fusão mitocondrial, uma GTP-ase denominada FZO, cuja falta causa a esterilidade em machos mutantes para o gene *fzo* durante a espermatogênese, por falhas no processo de fusão (HALES; FULLER, 1997). Hoje, sabe-se que FZO é membro de uma família de proteínas que são denominadas mitofusinas, as quais coordenam o processo de fusão em diversos organismos como leveduras, vermes e mamíferos. As mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2) atuam na MEM, enquanto a proteína *optic atrophy 1* (OPA1) atua na MIM. A fissão, por sua vez, é coordenada pelas clássicas dinaminas, principalmente pela DRP-1 (do inglês, *dynamain related protein*), que é denominada Dmn1 em leveduras (TILOKANI et al., 2018; WESTERMANN, 2010). Essas proteínas agem em vias de brotamento de vesículas, através de um mecanismo propiciado por estruturas oligoméricas que formam anéis e espirais ao redor da membrana, auxiliando a cisão por meio de mecanismos que envolvem a hidrólise de GTP e dependem do retículo endoplasmático. Este é recrutado para um sítio de constrição marcado pelo mt-DNA e diversas proteínas ligadas à MEM recrutam DRP-1 iniciando o processo. No que diz respeito à cisão da MIM, os mecanismos ainda não são bem esclarecidos, mas acredita-se que sua constrição seja dependente de  $Ca^{+}$  (LIU et al., 2020; WESTERMANN, 2010).

O desbalanço entre os eventos de fusão e fissão acabam por resultar em fragmentação excessiva ou uma rede hiper fundida, comprometendo as funções celulares (TILOKANI et al., 2018). Grandes redes parecem ser funcionalmente importantes em células metabolicamente ativas, relacionando-se com o estímulo da OXPHOS. (SKULACHEV, 2001; WESTERMANN, 2010). Se relacionam também com mecanismos de sobrevivência, protegendo a mitocôndria de processos de engolfamento em casos de autofagia desencadeada por deficiência nutricional (RAMBOLD et al., 2011; TILOKANI et al., 2018). Por outro lado, embora a fragmentação mitocondrial seja comum em disfunções mitocondriais, constituindo um estado morfológico recorrente em processos de morte celular ou de altos níveis de estresse, ela também é comum na fase G2/M do ciclo celular (ZEMIRLI; MOREL; MOLINO, 2018). Além disso, em células quiescentes são observadas numerosas e pequenas mitocôndrias, com formato esférico (TILOKANI et al., 2018). Ambos os processos estão intimamente relacionados com o  $\Delta\Psi_m$ , de forma que, falhas na dinâmica mitocondrial causadas por defeitos nas proteínas atuantes o afetam,

resultando em alterações na fisiologia mitocondrial como níveis de ROS e produção de ATP (WESTERMANN, 2010). A fusão mitocondrial contribui para a formação de uma rede com um sistema elétrico capaz de transmitir para a célula o  $\Delta\Psi_m$ , gerado pela OXPHOS, o que tem um papel essencial no que diz respeito a sinalização celular (SKULACHEV, 2001).

As mitocôndrias também possuem uma via de degradação própria, denominada mitofagia, a qual tem como função identificar e eliminar as organelas disfuncionais ou supérfluas, promovendo equilíbrio energético e contribuindo para a manutenção da saúde celular. Defeitos na mitofagia se relacionam com patologias comuns no envelhecimento e doenças neurodegenerativas, como Parkinson's, resultando no acúmulo de mitocôndrias defeituosas. Esse processo também exerce função importante à proteção celular contra estresses, como o oxidativo por exemplo, removendo mitocôndrias que estão produzindo níveis excessivos de ROS (LIU et al., 2020; MISHRA; CHAN, 2016).

Os mecanismos e vias de sinalização da mitofagia são classificados em dois tipos: 1) dependente de ubiquitina para reconhecimento dos pontos de degradação (CHEN; CHEN; HUANG, 2019; KHAMINETS; BEHL; DIKIC, 2016) e 2) mediado por receptores mitocondriais. No primeiro caso, na maioria das vezes há o envolvimento das proteínas PINK1 e Parkin (ligase de ubiquitina E3), quando sob estresse (geralmente por despolarização ou proteotoxicidade), ocorre a estabilização e acúmulo de PINK 1 na superfície mitocondrial, a qual recruta Parkin que, por sua vez, catalisa a ubiquitinação de proteínas da MEM. Resumidamente, essas proteínas permitem a construção de uma cadeia de ubiquitina ao redor da mitocôndria, facilitando o seu reconhecimento por um autofagossomo para entrar em processo de digestão nos lisossomos (CHEN; CHEN; HUANG, 2019; KHAMINETS; BEHL; DIKIC, 2016; LIU et al., 2020). Já a mitofagia mediada por receptor ocorre através de interação direta de proteínas da MEM com os autofagossomos, atuando como receptores através de motivos de interação, conhecidos como LIR (do inglês, *LC3-interaction region*). Essas proteínas específicas são ativadas para atuarem na degradação mitocondrial em resposta a estresse, comumente hipóxia (LIU et al., 2020).

### **3.2 Metabolismo mitocondrial**

Apesar dos estudos bioquímicos envolvendo enzimas e o metabolismo já ocorrerem há bastante tempo, as técnicas de isolamento da mitocôndria alcançadas aproximadamente na metade do século passado por A. Claude and C. de Duve revolucionaram essa área. A partir de então foram identificadas inúmeras enzimas que atuam em diversas vias metabólicas no interior da mitocôndria, provando-se assim a compartimentalização metabólica, ponto marcante na história evolutiva dos organismos eucarióticos (SCHEFFLER, 1999).

Primeiramente, a mitocôndria viabiliza maior eficiência na transformação energética a partir da glicose, levando à oxidação completa dessa molécula e uma produção rentável da principal moeda energética dos organismos (ATP). No citosol, a glicose é transformada em piruvato através da glicólise anaeróbica, liberando apenas uma pequena porção da energia livre potencialmente disponível. No entanto, o piruvato é um dos combustíveis mitocondriais, o qual através da MIM é transportado para a matriz e transformado em acetil-CoA pelo complexo piruvato-desidrogenase. Além disso, o acetil-CoA é um intermediário resultante não apenas da oxidação da glicose, mas também do catabolismo de outras macromoléculas (lipídeos e proteínas). Por exemplo, ácidos graxos também são transportados para mitocôndria, constituindo outro combustível mitocondrial, e uma vez na matriz, passam pelo processo de oxidação ( $\beta$ -oxidação), gerando acetil-CoA como produto (ALBERTS et al., 2002; SCHEFFLER, 1999). Este, por sua vez, é o produto inicial do ciclo TCA, comumente conhecido como ciclo de Krebs devido ao cientista H. Krebs que o postulou in 1937, antes mesmo de conhecer que este era um processo mitocondrial (SCHEFFLER, 1999). O TCA, como descrito abaixo, viabiliza o fluxo de elétrons, gerando nucleotídeos reduzidos que são substratos para o ETS mitocondrial trabalhar, produzir ATP em grande escala e atuar regulando diversos processos celulares.

### 3.2.1 Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

O TCA ocorre na matriz mitocondrial e tem sua função primária resumida como “oxidação de acetil-CoA em  $\text{CO}_2$ ” (Figura 1). Pelo fato de acetil-CoA ser produto não apenas do catabolismo de açúcares e lipídeos, mas também de proteínas, esse ciclo acaba sendo um ponto comum no metabolismo das principais macromoléculas dos organismos. Inicialmente, acetil-CoA se funde ao oxalacetato e uma reação de condensação pela citrato-sintase leva à formação de citrato, liberando CoA-SH e

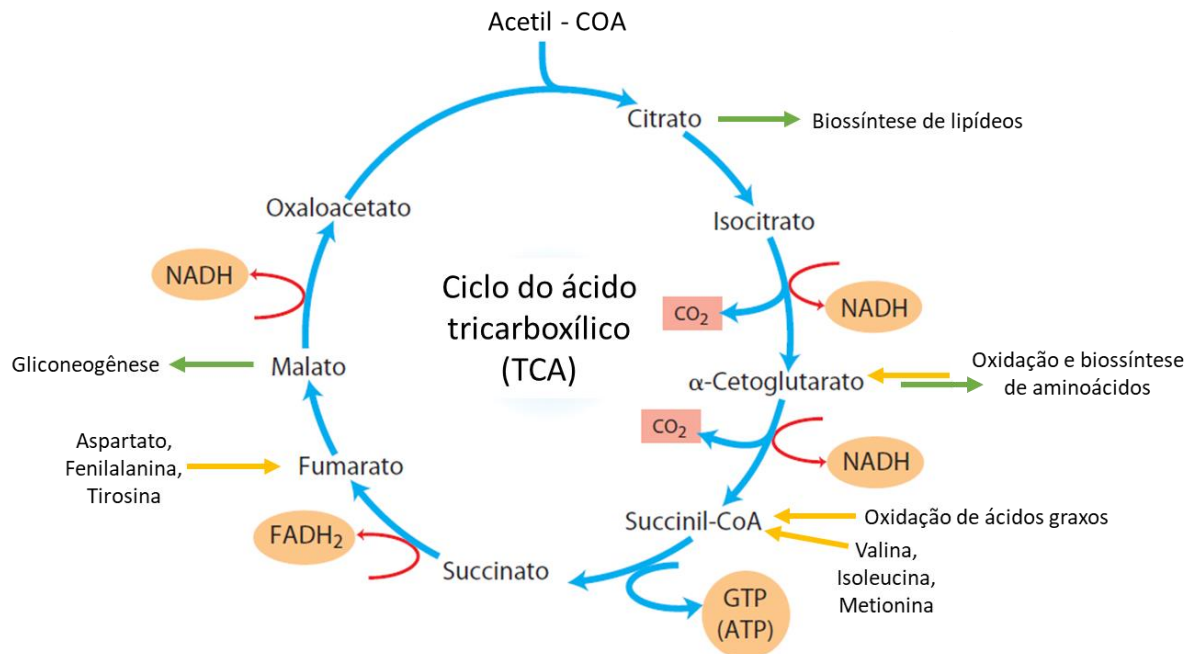
calor. Citrato é então desidratado pela aconitase gerando o intermediário cis-aconitato, que é reidratado pela mesma enzima, formando isocitrato. Sob ação da isocitrato desidrogenase esse composto é oxidado em oxalo-succinato, concomitantemente à redução de  $\text{NAD}^+$ , seguido de uma reação de descarboxilação que resulta em  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Este é então convertido em succinil-CoA por meio de outra descarboxilação pelo complexo  $\alpha$ -KG-desidrogenase, processo irreversível, que também demanda redução de  $\text{NAD}^+$  em NADH e adição de CoA-SH. A próxima etapa é desempenhada pela enzima succinato tioquinase a qual converte succinil-CoA em succinato através de uma reação de fosforilação a nível de substrato liberando GTP e CoA-SH. Seguidamente, succinato é convertido em fumarato pela succinato desidrogenase (também atuante no processo de OXPHOS, conhecida como complexo II) e este processo requer redução de FAD a  $\text{FADH}_2$  e proteínas Fe-S. Fumarato é hidratado pela fumarase, gerando malato, o qual é oxidado pela malato-desidrogenase, enzima dependente de  $\text{NAD}^+$ , e regenera oxalacetato (Figura 1), retornando ao ponto inicial do ciclo (AKRAM, 2014; SCHEFFLER, 1999).

Notavelmente, os nucleotídeos  $\text{NAD}^+$  e FAD reduzidos durante o TCA (três moléculas de  $\text{NADH}^+$  e uma de  $\text{FADH}_2$ ) irão carrear os elétrons que serão o combustível mitocondrial para produção de ATP. No, entanto, antes de detalharmos o complexo processo de OXPHOS, um dos enfoques desse trabalho, faz se importante explorar a relevância do TCA para além da catabolização do acetil-CoA. Esse ciclo pode ser regulado de acordo com a necessidade celular, exercendo um papel importante para vias biossintéticas, para as quais metabólitos são desviados e convertidos em glicose, ácidos graxos ou aminoácidos não-essenciais. À medida que intermediários deixam o ciclo, processo denominado cataplerose, outros precisam entrar, o que se chama anaplerose, garantindo assim a continuidade do mesmo, e conseqüentemente, o fluxo metabólico (Figura 1) (INIGO; DEJA; BURGESS, 2021; OWEN; KALHAN; HANSON, 2002). Por exemplo, piruvato carboxilase catalisa a formação de oxalacetato direto na mitocôndria, sendo considerada uma das principais enzimas anapleróticas, importante para abastecer o ciclo em condição de gliconeogênese ou lipogênese, quando malato ou citrato deixam o ciclo para formar glicose ou ácidos graxos, respectivamente (OWEN; KALHAN; HANSON, 2002).

Dentre as enzimas consideradas catapleróticas estão a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), aspartato aminotransferase, glutamato desidrogenase e citrato liase. A cataplerose evita o acúmulo em excesso de intermediários carregados

negativamente (ânions) na matriz mitocondrial, o que seria tóxico, e fornece intermediários para sustentar a biossíntese, favorecendo a conexão entre as vias e utilização eficiente dos recursos celulares. Além disso, a importância desse processo varia de acordo com o órgão/tecido animal e com as condições metabólicas. Por exemplo, em situações de jejum, no fígado, o fosfoenolpiruvato (PEP) é gerado a partir de oxaloacetato para ser usado na gliconeogênese. O citrato, por sua vez, ao deixar o ciclo, pode ser transformado em acetil-CoA usado para síntese de ácidos graxos (INIGO; DEJA; BURGESS, 2021; OWEN; KALHAN; HANSON, 2002).

Figura 1 - Representação esquemática simplificada do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)



As setas azuis representam as reações em uma única direção, mas a maioria são reversíveis (detalhes estão descritos no texto). As setas em vermelho indicam as etapas de produção dos nucleotídeos reduzidos. As setas verdes indicam reações de cataplerose e o destino do intermediário. As setas amarelas indicam reações de anaplerose a partir dos metabólitos indicados. Fonte: Reproduzido e adaptado de Nelson e Cox (2014, p. 649)

As reações de anaplerose e cataplerose são, de certa forma acopladas, mas o entendimento da regulação fina desses processos e do papel que ambas desempenham na regulação de cada via metabólica e em tecidos/condições específicas ainda demanda estudo. Pesquisas na área do câncer têm buscado explorá-las para maior entendimento dos mecanismos de proliferação celular a nível metabólico (OWEN; KALHAN; HANSON, 2002). Os tecidos proliferativos, de maneira

geral, apresentam produção de ATP majoritariamente mantida pelo metabolismo glicolítico, com elevado consumo de glicose em relação às células normais e alta secreção de lactato (DEBERARDINIS et al., 2008; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Essa configuração aparentemente paradoxal, por parecer ineficiente para sustentar o crescimento acelerado e acúmulo de biomassa, foi descrita inicialmente por Otto Warburg (WARBURG, 1956), conhecida então como efeito Warburg ou glicólise aeróbica, já que se mostra dependente do metabolismo oxidativo, e consequentemente, da funcionalidade mitocondrial. Isso porque é necessária intensa biossíntese de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, cujos precursores são provenientes do TCA, resultando, portanto, em elevado efluxo de intermediários. Apesar de haver diferentes mecanismos regulatórios, que variam, de acordo com o tipo de tumor, como por exemplo, o truncamento do TCA para saída de certo intermediário em direção a vias biossintéticas, o reabastecimento de intermediários via anaplerose é necessário. Por exemplo, um efeito comum em alguns cânceres é a utilização de glutamina como substrato anaplerótico, o que é denominado glutaminólise (DEBERARDINIS et al., 2008; YANG; VENNETI; NAGRATH, 2017). Além disso, a manutenção do TCA, é dependente da reoxidação de NADH e FADH<sub>2</sub>, que ocorre através da fosforilação oxidativa, de forma que o bloqueio do fluxo de elétrons acaba comprometendo a proliferação celular. Embora isso também requeira ainda mais estudos, envolvendo efeitos sistêmicos, a produção de ATP via OXPHOS não parece ser o fator mais essencial para suportar a proliferação celular, mas sim o fluxo de elétrons (GALBER et al., 2020; SULLIVAN et al., 2015).

### 3.2.2. Fosforilação oxidativa

A OXPHOS é o processo responsável pela maior parte da produção energética em forma de ATP para trabalho metabólico e mecânico nos organismos eucariotos (WILSON, 2017). Para isso, inicialmente reações exergônicas oxidam carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, gerando nucleotídeos ou outros intermediários reduzidos que serão reoxidados por componentes do ETS. Este é composto por diversas desidrogenases inseridas na MIM ou associadas, cuja a maioria atua reduzindo as CoQ, formando um sistema confluyente de transferência de elétrons, pois, uma vez reduzidas, as CoQH<sub>2</sub> são oxidadas pelo CIII e reações em cadeia por

intermédio do citocromo c, levam à redução do CIV, o qual reduz o oxigênio (aceptor final dos elétrons) a água (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2021; GNAIGER, 2020). A energia liberada por essas reações de óxido-redução é conservada através do bombeamento de prótons para o EIM pelos complexos I, III e IV, gerando um  $\Delta\Psi_m$ , e a energia potencial é a força próton-motriz utilizada para ATP-sintase realizar trabalho, resultando na fosforilação do ADP em ATP (MITCHELL, 1961; WILSON, 2017; ZOROVA et al., 2018).

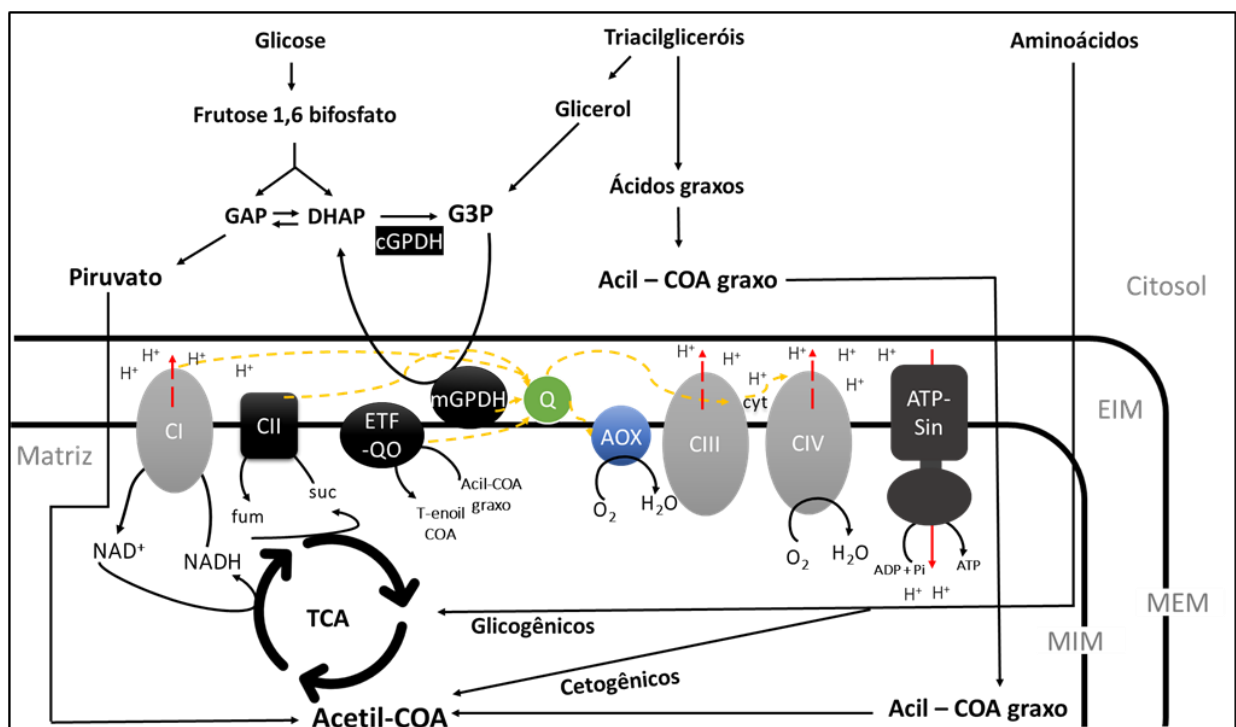
A energia potencial, entretanto, não é totalmente conservada, pois parte dos prótons retornam à matriz mitocondrial por vias além da ATP-sintase, variando de acordo com a composição da MIM, gerando um vazamento “próton leak”. Nesse caso, a energia que seria transformada em trabalho, é simplesmente dissipada como calor. Este processo pode ser inclusive regulado, envolvendo proteínas desacopladoras (UCP), especificamente a UCP1 em mamíferos (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; NICHOLLS, 2021), mas os detalhes podem ser encontrados na seção 3.3.1.

O aumento no vazamento de prótons afeta diretamente o  $\Delta\Psi_m$ , e em descontrole pode comprometer significativamente as funções celulares, assim como os níveis de ATP, sendo ambos parâmetros essenciais para mecanismos de sinalização celular. Inclusive, o  $\Delta\Psi_m$  é determinante ao processo de eliminação de mitocôndrias disfuncionais. É difícil estabelecer um valor ótimo de  $\Delta\Psi_m$ , principalmente porque pode haver uma variação de acordo com o tipo celular. No entanto, nas mitocôndrias que respiram normalmente, o  $\Delta\Psi_m$  é relativamente alto, com valores que variam entre 150 e 180 mV negativos para o citosol e favorecem a produção de ATP. Esses parâmetros também flutuam a curto prazo, para ajustes fisiológicos necessários, porém, perturbações a longo prazo são extremamente prejudiciais, pois comprometem a viabilidade celular e geram patologias como consequências. (CAMPANELLA et al., 2009; ZOROVA et al., 2018).

Valores excessivamente altos de  $\Delta\Psi_m$  aumentam a produção de ROS, moléculas derivadas da redução parcial do oxigênio, que podem reagir com proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, comprometendo suas funções nas células. As ROS são inerentes ao processo de transferência de elétrons, mas quando produzidas em excesso são tóxicas à célula e estão relacionadas aos processos de senescência celular e envelhecimento. Condições de “sobrecarga de elétrons” nos complexos respiratórios, dentre outros fatores, aumentam a sua produção a níveis que podem exceder a capacidade celular de gerar uma resposta antioxidante, criando

assim um estresse oxidativo (AON; CORTASSA; O'ROURKE, 2010; LAROSA; REMACLE, 2018; TRACHOOTHAM et al., 2008; ZHAO et al., 2019). Entretanto, ROS também podem atuar como moléculas sinalizadoras, impactando processos importantes, tais como a dinâmica de organização dos complexos respiratórios, apoptose, expressão gênica, respostas imunes e cicatrização (DUNNILL et al., 2017; PERILLO et al., 2014; SHEN; PERVAIZ, 2009; SPEIJER, 2011; TRACHOOTHAM et al., 2008). Valores muito baixos de  $\Delta\Psi_m$  também são danosos, já que além de causarem uma diminuição na produção de ATP, geram o que é chamado de estresse redutivo (diminuição excessiva de ROS), o qual é tão prejudicial quanto o estresse oxidativo. Portanto, a manutenção do  $\Delta\Psi_m$  e dos níveis de ATP a longo prazo é essencial à preservação da homeostase celular (ZOROVA et al., 2018).

Figura 2 - Diagrama simplificado da integração da energia de diferentes vias metabólicas através do ETS mitocondrial.



As setas amarelas pontilhadas indicam a direção da transferência de elétrons. As setas vermelhas indicam o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas (EIM). A seta vermelha contínua indica o retorno protônico através da ATP-sintase. CI-CIV, complexos I-IV; Q, coenzima Q; cyt, citocromo c; ETF-QO, flavoproteína de transferência de elétrons: ubiquinona oxidoreductase; mGPDH, glicerol-3-fosfato-desidrogenase mitocondrial; cGPDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica; AOX, oxidase alternativa; ATP-Sin, ATP-sintase; MIM, membrana interna mitocondrial; MEM, membrana externa mitocondrial; TCA, ciclo do ácido; fum, fumarato; suc, succinato. GAP, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, di-hidroxiacetona-fosfato, G3P, glicerol-3-fosfato. Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.3 Componentes do ETS clássico: estruturas e funções

#### 3.2.3.1 CI, CIII e CIV

Dentre os componentes do ETS, os complexos proteicos são os mais conhecidos, e em conjunto com a ATP-sintase são comumente referidos como cadeia respiratória. Os bombeadores de prótons (CI, CIII e CIV) são compostos por diversas subunidades codificadas pelo nDNA e pelo mtDNA e podem se interagir fisicamente (detalhes na seção 3.2.6), formando superestruturas chamadas de supercomplexos (SC). O CI (NADH:ubiquinona oxidoreductase) é maior dentre eles, com aproximadamente 45 subunidades (dados de mamíferos), cujo processo de montagem é regulado por pelo menos 14 fatores de montagem. Tais subunidades se organizam em formato de L, com um braço membranar e outro periférico (voltado à matriz). O braço membranar (módulo P) fica totalmente inserido na MIM e é envolvido com o bombeamento de prótons. O braço periférico é voltado à matriz, composto pelo módulo N, responsável pela oxidação de NADH, e pelo módulo Q, o qual é adjacente à MIM e atua reduzindo as CoQ. Além disso, há uma cadeia de aglomerados de Fe-S que conectam o fluxo de elétrons através de todo o complexo (GUERRERO-CASTILLO et al., 2017; SZCZEPANOWSKA et al., 2020).

Em vários sítios do CI podem se originar ROS, mas principalmente no módulo N, onde se ligam as moléculas de NADH e no sítio de ligação à CoQ. É importante ressaltar que, dentre as desidrogenases, o CI é o único responsável pela reoxidação de NADH e defeitos que o atingem são relacionados com o envelhecimento e com a patogênese de diversas doenças, incluindo Parkinson's, câncer e diabetes (FIEDORCZUK; SAZANOV, 2018; STEFANATOS; SANZ, 2011; SZCZEPANOWSKA et al., 2020). Cerca de um terço das doenças mitocondriais são causadas isoladamente por defeitos no CI e o diagnóstico molecular de muitas patologias ainda não é claro, considerando a complexidade da enzima e do seu processo de montagem e regulação. As manifestações clínicas, assim como para doenças relacionadas a outros complexos do ETS, são diversas e heterogêneas, muitas vezes fatais. Dentre elas estão a síndrome de Leigh (LS), acidose láctica infantil (FILA), cardiomiopatia neonatal, encefalopatias e miopatias diversas (GHEZZI; ZEVIANI, 2018).

O CIII (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase ou citocromo bc1) possui estrutura homodimérica, sendo que cada monômero pode conter até 11 subunidades,

o que varia entre os grupos de organismos, porém 3 subunidades são principais, com propriedades catalíticas, pelas quais há condução dos elétrons (BRZEZINSKI; MOE; ADELROTH, 2021; IWATA et al., 1998; LANGE; HUNTE, 2002). A primeira é a citocromo b, com dois grupos hemes B e dois sítios de ligação à CoQ; a segunda é a citocromo c1, que apresenta um grupo heme C e interage com o citocromo c; a terceira é denominada Rieske, onde se localiza um centro de 2Fe-2S. Esse complexo é um componente central do ETS, uma vez que ele oxida as moléculas de CoQ reduzidas pelas diversas desidrogenases que atuam como porta de entrada dos elétrons. Cada molécula de CoQ reduzida carrega dois elétrons (CoQH<sub>2</sub>), e a sua oxidação ocorre no sítio quinol oxidase (Q<sub>o</sub>), região de interação entre Rieske com citocromo b. O mecanismo de oxidação é cíclico (do inglês, *Q-cycle*) e ainda é estudado para melhor entendimento. Basicamente, ocorre bifurcação dos elétrons, sendo que um deles é transferido para Rieske (cadeia de alto potencial), seguindo para o citocromo c1 que será oxidado pelo citocromo c, o qual conseqüentemente reduzirá o CIV. Com isso, uma semiquinona (CoQH) permanece no sítio Q<sub>o</sub>, e esta é oxidada pela cadeia de baixo potencial no citocromo b. Após duas renovações do sítio Q<sub>o</sub>, os dois elétrons que vieram de duas CoQH reduzem totalmente uma CoQ à CoQH<sub>2</sub> no sítio da quinona redutase (Q<sub>i</sub>) podendo ser reiniciado o ciclo. Esse processo permite o bombeamento de prótons, de modo que a cada dois elétrons transferidos à cadeia de alto potencial, dois prótons são captados da matriz e dois são liberados no EIM (BRZEZINSKI; MOE; ADELROTH, 2021; CHENNA et al., 2022; MULLER; CROFTS; KRAMER, 2002).

O CIII, dentre todos os outros locais no ETS, apresenta a maior capacidade de produção de ROS em seu sítio Q<sub>o</sub>, embora em condições fisiológicas, a geração de ROS mediada por CI parece ter maior magnitude. Por outro lado, quando CI gera menos ROS, aquelas geradas via CIII se tornam mais relevantes (CHENNA et al., 2022). Defeitos no CIII são considerados mais raros, o que acaba tornando-os menos estudados também, se comparados ao CI e ao CIV, mas podem afetar diversos órgãos com manifestações clínicas que incluem fadiga muscular, intolerância ao exercício, acidose láctica, distúrbios neurodegenerativos, sendo muitas doenças também fatais ainda na infância (GHEZZI; ZEVIANI, 2018).

O CIV ou citocromo c oxidase (COX) catalisa a última reação do ETS, que é a transferência de elétrons do citocromo c ao aceptor final, o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a água. Em mamíferos ele apresenta 14 subunidades, porém seu core catalítico é composto por 3 subunidades principais (COX1, COX2 e COX3) codificadas pelo mtDNA e com

estruturas conservadas desde os ancestrais mitocondriais até os humanos (SOTO et al., 2012; TIMÓN-GÓMEZ et al., 2018). O core catalítico contém cofatores e grupos prostéticos, tais como heme e íons de cobre (Cu), os quais compõem o centro metal redox do complexo e são requeridos para a transferência de elétrons. COX1 e COX2 são também responsáveis pela translocação de prótons, possibilitada pela presença de canais hidrofílicos em seu interior. Enquanto COX1 e COX3 são proteínas integrais de membranas, COX2 apresenta um domínio extra-membrana, solúvel, o qual se liga ao citocromo c. Um centro di-cobre (CuA) localizado na parte inferior desse domínio, próximo a COX2 recebe os elétrons, os quais fluem para a heme de COX1 e são transferidos ao centro bi-nuclear heme a<sub>3</sub>-CuB, onde há a redução do O<sub>2</sub>. Sabe-se que ao longo da evolução, mamíferos tiveram diversas subunidades “adicionadas” ao core catalítico, as quais se relacionam com as necessidades diversas do organismo, principalmente no que diz respeito à adaptação celular a ambientes ricos em oxigênio e atuam na regulação de OXPHOS. A regulação é complexa e varia em um mesmo organismo, havendo isoformas tecido-específicas para um mesmo organismo (TIMÓN-GÓMEZ et al., 2018; WATSON; MCSTAY, 2020). Além disso, mais de 30 fatores de montagens atuam para que esse complexo se componha em um processo ainda abstruso, que requer entendimento (TIMÓN-GÓMEZ et al., 2018).

A produção de ROS pelo CIV é considerada insignificante, entretanto, deficiências relacionadas a esse complexo, assim como para os demais complexos, são marcas bioquímicas de doenças mitocondriais (BOURENS et al., 2013; GHEZZI; ZEVIANI, 2018). As manifestações são semelhantes aos demais complexos, como LS e fenótipos de encefalocardiomiopatias. Algumas mutações de COX são herdadas maternamente, porém a maioria dos defeitos nesse complexo é causado devido a mutações em genes do nDNA que codificam os fatores de montagens ou/e se relacionam com a biossíntese e incorporação dos grupos prostéticos (GHEZZI; ZEVIANI, 2018).

### 3.2.3.2 CII, mGPDH e outras desidrogenases associadas a FAD

O ETS apresenta outras “portas de entrada” de elétrons além do CI, as quais são desidrogenases associadas a FAD, como o CII, que é o mais conhecido. Apesar de os livro-textos darem enfoque a esses dois complexos, há aproximadamente nove diferentes desidrogenases que têm como ponto em comum a redução das CoQ, mas

a presença e importância delas é variável de acordo com o tecido animal (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2021). O CII (succinato desidrogenase, SDH) é formado por apenas 4 subunidades, todas codificadas pelo nDNA que se arranjam semelhantemente entre a maioria dos grupos de organismos, apresentando um formato de cogumelo. A cabeça é hidrofílica, onde estão a subunidade de ligação a FAD (SDHA) e outra subunidade que contém aglomerados de Fe-S (SDHB). Já a cauda é hidrofóbica, contém duas subunidades (SDHC e SDHD) que se ancoram na MIM e abrigam um grupo heme. São os grupos prostéticos que viabilizam a transferência de elétrons às CoQ (DU et al., 2023).

O CII é o um conector direto entre o TCA e a OXPHOS, uma vez que oxida succinato a fumarato, enquanto reduz FAD a FADH<sub>2</sub> no TCA e reduz as CoQ, reoxidando FADH<sub>2</sub> a FAD no ETS mitocondrial (DU et al., 2023; SUN et al., 2005). Ele também produz ROS, sendo o terceiro de ordem de magnitude, através do sítio nomeado como IIF (especificamente onde se liga FAD), cujo aumento se dá tanto devido à perda de função quanto através de inibição farmacológica (HADRAVA VANOVA et al., 2020; QUINLAN et al., 2013a; ZHANG et al., 2015). Além da produção direta de ROS, o CII causa a produção indireta em outros sítios, o que lhe confere o papel de modulador dos níveis de ROS também. Já foi observado que o acúmulo de succinato e aumento do fluxo de elétrons que entram no ETS via CII, com o consequente acúmulo de CoQH<sub>2</sub> levam ao aumento da produção de ROS pelo CI, um processo denominado transporte reverso de elétrons (do inglês, RET) com papéis tecido-específicos (DU et al., 2023; HADRAVA VANOVA et al., 2020).

Defeitos nesse complexo, podem elevar a produção de ROS e se relacionam com doenças mitocondriais primárias, cujas manifestações clínicas são clássicas em conjunto com defeitos em outros componentes do ETS. Apenas 2 % dos diagnósticos de deficiências nesses componentes são resultantes de defeitos isolados do CII, as quais se apresentam principalmente como desordens neurológicas que afetam diversos órgãos. Notavelmente, a suscetibilidade a tumorigênese é uma manifestação fortemente relacionada com disfunções no CII, as quais se associam com a oncogênese de tumor estromal gastrointestinal e carcinoma renal. Assim, alguns de seus genes são considerados, de fato, supressores tumorais, e mutações são correlacionadas a neoplasias mamárias, endometriais, e de tireoide (DU et al., 2023; HADRAVA VANOVA et al., 2020).

Outra importante desidrogenase que têm papel essencial em diversos tecidos animais é a mGPDH, cuja estrutura, embora ainda não se tenha uma definição cristalográfica, é considerada simples a partir de comparações entre sequências de aminoácidos com proteínas homólogas de bactérias. É provável que mGPDH não seja uma proteína integral de membrana (ausência de hélices transmembranas), mas sim uma proteína periférica, dimérica e associada ao folheto externo da MIM. Além disso, essa enzima não parece ter grupos prostéticos metálicos, permitindo-se assumir que o mecanismo redox seja diferente da maioria das desidrogenases que atuam no ETS mitocondrial (MRÁČEK; DRAHOTA; HOUŠTĚK, 2013; YEH; CHINTE; DU, 2008). Ela também apresenta um domínio de ligação a  $Ca^{+}$ , elemento que em altas concentrações, é capaz de aumentar afinidade da enzima pelo seu substrato, o glicerol-3-fosfato (G3P) (WERNETTE; OCHS; LARDY, 1981). Importaneamente, mGPDH é um componente do ETS que conecta a glicólise, o metabolismo de lipídeos e a OXPHOS através da oxidação de G3P em di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP), com a reoxidação de  $FADH_2$ , e consequente redução das CoQ (Figura 2). Junto com a GPDH citoplasmática (cGPDH), a mGPDH forma um sistema de lançadeira que atua também na reoxidação de NADH citosólico, dispensando a ação do CI (MRÁČEK; DRAHOTA; HOUŠTĚK, 2013).

Sabe-se também que a oxidação de G3P por si só é um estímulo à produção de ROS mitocondrial, o que faz da mGPDH não apenas uma produtora direta no seu sítio de ligação à CoQ, mas também uma estimuladora de ROS em outros sítios nos diferentes complexos do ETS. Isso ocorre através de um mecanismo semelhante ao CII, possivelmente, através de RET. Estudos já mostraram que há diferentes variáveis que afetam a produção de ROS atrelada à mGPDH, dentre as quais estão o nível de expressão da enzima, variável de acordo com o tecido animal também, a concentração de G3P, a concentração de  $Ca^{+}$  e o estado de redução do pool de CoQ (ORR et al., 2012; QUINLAN et al., 2013a, 2013b).

Altos níveis de mGPDH são encontrados nos tecidos adiposo marrom, muscular e nervoso de mamíferos, e basicamente em todos os tecidos de insetos (MRÁČEK; DRAHOTA; HOUŠTĚK, 2013). Estudos já reportaram que em músculo esquelético, mGPDH atua como um regulador crítico da regeneração muscular, uma condição muito afetada negativamente em pacientes que apresentam diabetes e obesidade. O mecanismo pelo qual isso ocorre é relacionado com o controle da biogênese mitocondrial. Interessantemente, baixos níveis de mGPDH são reportados

em pacientes e animais modelo que apresentam diabetes e/ou obesidade, assim como mutantes para mGPDH apresentam baixa regeneração muscular (tanto *in vivo* como *in vitro*), enquanto a superexpressão leva a melhoras no quadro de distrofia muscular (LIU et al., 2018).

Como já discorrido, células tumorais de crescimento rápido são predominantemente glicolíticas, mas também são produtoras de níveis elevados de ROS, e apresentam elevados níveis de mGPDH, indicando um papel importante dessa enzima para a manutenção do estado proliferativo em câncer de próstata (CHOWDHURY; GEMIN; SINGH, 2005; ROY CHOWDHURY et al., 2007). Por outro lado, um estudo recente apontou que um desbalanço no sistema de lançadeira, com a reação citosólica aproximadamente cinco vezes mais intensa do que a reação mitocondrial, sustenta a síntese de lipídeos em células de câncer de rim. A inibição da mGPDH não causou efeito significativo na respiração mitocondrial, e sua perda causou, na verdade, aumento da expressão de cGPDH e aumento da proliferação celular (YAO et al., 2023). De fato, já se sabe que em levedura, que também são células de proliferação rápida, o acúmulo de gordura em oleaginosas é aumentado por superexpressão de cGPDH, o que eleva os níveis de G3P. Além disso, quando se combinam defeitos na lançadeira de G3P a uma via de beta-oxidação deficiente, ocorre aumento de ácidos graxos livres e triacilgliceróis, gerando linhagens que acumulam até 75 % de massa seca composta por lipídeos (DULERMO; NICAUD, 2011). Uma vez que os triacilgliceróis constituem a principal fonte de reserva dos organismos e os ácidos graxos e o G3P são seus precursores essenciais, estudar como esse sistema de lançadeira atua nos organismos tem sido promissor (XUE; CHEN; JIANG, 2017). Para além dos fins biomédicos e entendimento de patologias, a pesquisa de cunho biotecnológico voltada à produção de ácidos orgânicos e enzimas, se mostra muito propícia, candidatando tais leveduras oleaginosas como produtoras unicelulares de óleo (DULERMO; NICAUD, 2011; XUE; CHEN; JIANG, 2017; YAO et al., 2023).

Em insetos, como a *D. melanogaster*, a mGPDH é uma desidrogenase com participação significativa na respiração mitocondrial. Ao tecido muscular, o sistema de lançadeira é essencial ao músculo do voo, de modo que mutantes tanto para mGPDH quanto para cGPDH são incapazes de voar (CARMON et al., 2009). Em larvas já se sabe que a cGPDH é fundamental para compensar a ineficiência de lactato desidrogenase (LDH) e suportar o crescimento intenso que ocorre nessa fase do

desenvolvimento da mosca, o que também tem sido explorado para entendimento da base metabólica de tecidos proliferativos (LI et al., 2019). Entretanto, um estudo profundo da via da mGPDH no ETS de larvas ainda se faz necessário. Em outro inseto, mamangava *Bombus terrestris*, a mGPDH possui um papel termogênico que é importante para o preaquecimento dos músculos do voo durante o inverno. Em baixas temperaturas, a oxidação de G3P está associada ao consumo de oxigênio desacoplado da produção de ATP, que culmina na dissipação de calor necessário para este pré-aquecimento (MASSON et al., 2017).

Dentre as demais desidrogenases que podem compor o ETS dos organismos, está a flavoproteína de transferência de elétrons: ubiquinona oxidoreductase (ETF-QO) que conecta a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos a OXPHOS, recebendo elétrons de diversas desidrogenases e transferindo-os às CoQ, a partir de FADH<sub>2</sub>. Defeitos nessa enzima podem ser causa de patologias metabólicas relacionadas a disfunção mitocondrial e acúmulo de lipídeos (CHOKCHAIWONG et al., 2019; WATMOUGH; FRERMAN, 2010). A ProDH é outro componente, que além de se relacionar com o metabolismo de aminoácidos, tem importância para geração de energia para o voo em insetos ao oxidar o aminoácido prolina a pirrolina-5-carboxilato, associada a redução de FADH, que é reoxidado com a transferência de elétrons à CoQ (TEULIER et al., 2016). Ambas as enzimas se associam ao folheto interno da MIM e possuem atividade bastante dependente do Cl, principalmente por conta da reoxidação de NADH que é gerado no processo de  $\beta$ -oxidação ou no processo de oxidação da pirrolina-5-carboxilato a glutamato em reações subsequentes, que também dependerão do piruvato posteriormente para que o glutamato seja transformado em  $\alpha$ -KG e adentre ao TCA (GNAIGER, 2020; TEULIER et al., 2016; WATMOUGH; FRERMAN, 2010).

Ainda há a di-hidroorotato desidrogenase (DHODH) que ao transferir elétrons a CoQ, converte di-hidroorotato a oroorato, um precursor da síntese *de novo* de pirimidinas que fornecerá nucleotídeos para RNA e DNA, exercendo função também sobre a proliferação celular (BANERJEE; PURHONEN; KALLIJÄRVI, 2021; BOUKALOVA et al., 2020). Outras duas desidrogenases têm relação direta com o metabolismo de aminoácidos, as quais são a dimetilglicina desidrogenase (DMGDH) e a sarcosina desidrogenase (SarDH), participantes da biossíntese de glicina e metionina, através da via de oxidação de colina (BRESSON et al., 2016; SALVI; GADDA, 2013; STEENKAMP; HUSAIN, 1982).

### 3.2.4 ATP-Sintase

Para que a energia dos elétrons, então transformada em potencial pelo bombeamento de prótons seja transformada em ATP, a ATP-sintase atua como um motor rotatório, de forma que o retorno protônico através dela lhe capacita a realizar trabalho e catalisar a ligação de fosfato inorgânico a ADP (JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURG, 2012; YOSHIDA; MUNEYUKI; HISABORI, 2001). Esse mecanismo físico de catálise é diferente de qualquer outra enzima conhecida, o que faz da ATP-sintase um complexo enzimático único, além de altamente conservado ao longo da evolução entre os organismos. Sua estrutura é encontrada em dímeros (dados de humanos), sendo que cada monômero apresenta, pelo menos, 16 subunidades diferentes que se organizam em dois domínios funcionais: o  $F_1$ , projetado na matriz, é composto por uma porção esférica ( $\alpha_3\beta_3$ ) e por subunidades denominadas  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ , as quais formam uma haste central que se conecta com o outro domínio, o  $F_0$ . Este fica embebido na MIM, com aproximadamente 9 subunidades c formando um anel (*c-ring*), além de outras subunidades (a, e, f, g, A6L e b). A parte b se estende à matriz, se unindo a outras subunidades (d,  $F_6$  e OSCP), formando um pedúnculo, que se conecta ao domínio  $F_1$ . Apenas 2 subunidades são codificadas pelo mtDNA (a e A6L), sendo as demais todas codificadas pelo nDNA, com um processo de montagem que também é muito complexo. Mutações em genes que codificam diversas subunidades já foram identificadas, as quais podem ser herdadas maternamente, no caso daquelas que ocorrem no mtDNA, ou são de caráter autossômico, envolvendo subunidades estruturais e catalíticas. O resultado de problemas na ATP-sintase é o desenvolvimento de distúrbios neuromusculares graves (GALBER et al., 2020; JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURG, 2012; LOVERO et al., 2018). Ainda há carência de estudos com modelos biológicos que ajudem entender a base molecular e bioquímica de doenças relacionadas a esses distúrbios, porém, um estudo recente caracterizou efeitos de diferentes mutações isoladas no gene *ATPsynC*, que codifica a subunidade c na porção  $F_0$ , em linhagens de *D. melanogaster*. Uma ampla gama de fenótipos foi observada, incluindo efeitos pleiotrópicos, problemas reprodutivos, locomotores e falhas no desenvolvimento (LOVERO et al., 2018).

A ATP-sintase é capaz de trabalhar em um modo reverso, hidrolisando ATP (papel de ATPase) e bombeando prótons para o EIM, o que contribui para a manutenção do  $\Delta\Psi_m$ . Isso pode ser importante em situações de muito baixo  $\Delta\Psi_m$

ou baixa disponibilidade de oxigênio, o que comprometeria a respiração e funções mitocondriais. Esse mecanismo, entretanto, deve ser regulado, evitando a hidrólise excessiva e depleção nos níveis de ATP. Uma proteína denominada IF1 atua nesse processo, evitando a atividade de ATPase, de acordo com o pH, de modo a se tornar ativa apenas quando os valores ficam abaixo de 6,5 (GALBER et al., 2020; JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURG, 2012; YOSHIDA; MUNHEYUKI; HISABORI, 2001). Altos níveis de IF1 são observados em certos tumores e células cancerígenas, e isso leva a inibição não apenas da atividade hidrólise, mas também de síntese de ATP (SÁNCHEZ-CENIZO et al., 2010).

As funções da ATP-sintase na progressão do câncer têm sido exploradas, pois além de se constituir um dos principais reguladores de OXPHOS, ela tem sido proposta como formadora de mega-canais, os PTPs (do inglês, *permeability transition pore*) que promovem a apoptose, mas a sua dessensibilização é um ponto chave para o desenvolvimento de câncer. Desse modo, além de desempenhar funções no que diz respeito à base metabólica do câncer, pois é um fator limitante ao fluxo de elétrons para manutenção das vias biossintéticas, ela se relaciona com a inibição apoptótica, se constituindo um alvo terapêutico para desenvolvimento de estratégias contra o câncer (LOVERO et al., 2018).

### 3.2.5 Enzimas alternativas (EA)

Adicionalmente aos componentes já descritos, a maioria dos grupos de organismos, incluindo plantas, protozoários e vários metazoários, apresentam EA no ETS, com a capacidade de substituir parcialmente a atividade do CI (no caso da NADH desidrogenase, ANDH) ou dos complexos III-IV (no caso da AOX). Especialmente mamíferos e insetos perderam os genes que codificam EA ao longo da evolução e o valor adaptativo dessas vias alternativas aos organismos que a possuem ainda é bastante discutido (MCDONALD et al., 2015; MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019; MCDONALD; VANLERBERGHE, 2005; MCDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009).

Embora o ETS clássico, como o de mamíferos, seja eficiente, sua maquinaria com montagem extremamente complexa parece oferecer pouca plasticidade aos organismos frente a mudanças repentinas no meio externo (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019). As EA, por outro lado, são enzimas estruturalmente simples,

que não são transmembranas, formadas por subunidade única, isto é, um único polipeptídeo codificado exclusivamente pelo nDNA. As funções de química redox das EAs são semelhantes aos dos complexos para os quais elas são alternativas, oferecendo resistência aos inibidores rotenona (no caso do CI), e antimicina A e cianeto de potássio (inibidores do CIII e CIV, respectivamente). Entretanto, tais enzimas não realizam bombeamento de prótons para o EIM, não contribuindo assim para o potencial eletroquímico que seria utilizado pela ATP-sintase para produzir ATP (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019; RASMUSSEN; FERNIE; VAN DONGEN, 2009; SAARI et al., 2019b).

As EA, provavelmente, forneceram capacidade de adaptação às constantes mudanças ambientais no início da vida na Terra, principalmente no que diz respeito às concentrações de O<sub>2</sub> e à proteção contra ROS. Aos organismos predominantemente fermentativos, a manutenção das EA conferiu vantagem energética, considerando que o processo de montagem dos complexos é dispendioso. Além disso, as EA atuam diminuindo as ROS e podem ainda substituir os complexos que também são danificados pelas próprias ROS, atuando como uma muleta essencial em mudanças de condições físico-químicas que propiciem o estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011; MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019).

As plantas, em especial, estão constantemente sob múltiplos estresses, incluindo hipersalinidade, seca, excesso de luz etc., os quais intensificam a produção de ROS, não apenas mitocondriais, mas também plastidiais. As flutuações de condições, incluindo alagamentos (hipóxia), no caso das plantas terrestres, ou condições de anaerobiose prolongada em plantas aquáticas e algas, também atuaram como pressão seletiva às EA. Desse modo, evoluíram-se sistemas antioxidantes robustos, incluindo essas enzimas, que em organismos sésseis conferem alta vantagem, uma vez que eles são incapazes de evitar estresse através de um mecanismo de fuga (LUSHCHAK, 2011; MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019; RASMUSSEN; FERNIE; VAN DONGEN, 2009).

Uma função muito bem estabelecida das EA é a termogênese em algumas plantas, as quais, nesse caso, têm grande parte dos elétrons que chegam ao ETS desviados através de vias alternativas. Já que as EA não bombeiam prótons, a energia que seria conservada para produção de ATP é dissipada em grande quantidade, gerando calor suficiente para o aquecimento de órgãos específicos (MEEUSE, 1975; MOORE et al., 2013; RASMUSSEN; FERNIE; VAN DONGEN, 2009). Por exemplo,

na flor-de-lótus *Nelumbo nucifera* (Magnoliophyta: Nelumbonaceae), aproximadamente 75 % dos elétrons que entram no ETS levam à redução do oxigênio via AOX, o que aumenta a temperatura dos órgãos florais e contribui para a volatilização de compostos importantes para a atração de polinizadores (WATLING; ROBINSON; SEYMOUR, 2006). Membros da família Araceae também aumentam sua temperatura interna durante o florescimento (WAGNER et al., 2008), como é o caso da *Symplocarpus foetidus* (Liliopsida: Araceae), que 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, 1974). Mesmo em plantas que não são consideradas termogênicas, sabe-se que o frio ativa a AOX, o que indica um papel significativo dessa enzima para lidar com o estresse térmico frio, conforme já foi mostrado em estudos com tubérculos de batata. Estes, quando submetidos ao frio de 5 °C, apresentaram um aumento de dez vezes na atividade da enzima em relação à condição controle de 25 °C (BORECKÝ; VERCESI, 2005).

Por muito tempo acreditou-se que EA estivessem ausentes em animais, mas trabalhos de sequenciamento têm apontado a presença dos genes dessas enzimas em diversos filos, sendo os mais recentes e surpreendentes achados dentro do grupo Eumetazoa. Até mesmo no filo Arthropoda, cuja presença de AOX era desconsiderada, foram detectadas as sequências dessa enzima em *Chelicerata*, *Hexapoda* e *Crustacea*. Apesar da discussão acerca da possibilidade de que alguns resultados sejam devido a contaminações, principalmente por endossimbiontes que apresentam as EA, demandando cautela, diferentes estudos provam que as enzimas são cataliticamente ativas em diversos grupos e sistemas biológicos, ainda que apenas em condições específicas (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019; SAARI et al., 2019b).

Dentre as principais características que unem os organismos que possuem EA, o estilo de vida sésil ou com baixa locomoção, pelo menos em alguma fase durante o ciclo de vida, se destaca (MATUS-ORTEGA et al., 2011; MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019). Entretanto, os achados mais recentes têm colocado em xeque essa consideração, principalmente devido a identificação de EA em moluscos ativos. Assim, a história de vida desses organismos com transições entre hipóxia e reoxigenação parece ser um dos fatores que favoreceu a evolução do ETS com vias alternativas. Essas condições se assemelham, de certa forma, com aquelas que ocorrem em isquemia-reperusão, infarto e até acidente vascular cerebral em

humanos. Outra característica comum entre os organismos que apresentam EA é a alta capacidade de regeneração, e isso também parece se relacionar com maior capacidade de alternar entre o metabolismo glicolítico e oxidativo das células estaminais em condições de transição entre hipóxia e reoxigenação (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2019).

É possível argumentar ainda sobre a importância que as EA exercem no processo de adaptação a ambientes diferentes, influenciando nos ajustes metabólicos celular, levando em conta a diversidade de patógenos que possuem AOX. Esta atua na patogenicidade, facilita a transição entre hospedeiros e/ou diferentes estágios, lidando com processos inflamatórios, dentre outros papéis que são especulados, como a produção de calor necessária para seu crescimento. Dentre os patógenos, estão o *Trypanosoma brucei*, *Cryptosporidium parvum*, *Acanthamoeba* e fungos como a *Candida ssp*. O último tem trazido preocupação e interesse farmacêutico, inclusive, devido a multirresistência a drogas, a qual pode estar relacionada com a AOX (SZIBOR et al., 2022)

#### 3.2.5.1 Oxidase alternativa (AOX) e sua abordagem terapêutica

Pensando nas propriedades das EA, especialmente pelo potencial em diminuir o excesso de ROS, elas têm sido exploradas em busca de ferramentas terapêuticas para o tratamento não apenas de doenças mitocondriais primárias, que são causadas por mutações no nDNA ou mtDNA, mas também condições patológicas secundárias que se relacionam com a mitocôndria. Neste trabalho, focaremos na AOX, que oxida as  $\text{CoQH}_2$  e reduz o oxigênio à água (Figura 2), contornando assim o segmento do citocromo c (CIII e CIV) (JUSZCZUK; RYCHTER, 2003), com potencial para ajudar principalmente em condições de estresse respiratório ou sobrecarga dos CIII e CIV. Sua estrutura foi descrita para *Trypanosoma brucei* e semelhantemente em plantas, estabelecendo que ela é uma proteína dimérica, semi-integral de membrana, com sítio ativo contendo um centro di-ferro (ROGOV et al., 2014; SHIBA et al., 2013). Os mecanismos de regulação da AOX são mais estudados em plantas e requer maior entendimento para a maioria dos grupos, principalmente no que diz respeito à base molecular. No geral, sabe-se que elas podem ser reguladas pelo estresse, incluindo o térmico. Condições estressantes que levam a distúrbios metabólicos, principalmente em decorrência à sobrecarga ou disfunções no ETS, acabam acumulando piruvato,

que é um ativador de AOX (HOEFNAGEL; WISKICH, 1998; SIERRA-CAMPOS et al., 2009). Além do piruvato, outros metabólitos e ácidos orgânicos, como diversos intermediários do TCA (SELINSKI et al., 2018), que se acumulam por motivos semelhantes atuam ativando a AOX. Também já foi reportado que o  $\text{Ca}^+$  e nucleotídeos de purina ativam essa EA. Do que se sabe para a AOX vegetais, possivelmente a sua ativação se deva à ativação do dímero que ocorre devido à quebra de pontes dissulfeto, além de haver regulação alostérica e a nível transcricional (SAARI et al., 2019b).

Métodos de alinhamento de sequências e modelagem molecular, mostraram que AOX de *C. intestinalis* tem similaridade com essa estrutura também (ANDJELKOVIĆ et al., 2015). Uma propriedade bioquímica da AOX, relevante do ponto de vista terapêutico, é a limitação da sua atividade a condições metabólicas onde ela é requerida funcionalmente, sendo teoricamente amorfa em condições fisiológicas, principalmente devido ao seu  $K_m$  para o  $\text{CoQH}_2$  ser muito mais elevado do que o CIII (HOEFNAGEL; WISKICH, 1998; SAARI et al., 2019b).

A sua abordagem terapêutica tem sido testada a partir da expressão xenotópica do gene da AOX proveniente de *C. intestinalis* em diversos modelos biológicos, como células em cultura, camundongos e em moscas *D. melanogaster*, acumulando até então resultados promissores, como já introduzidos. Além de serem resistentes aos inibidores dos complexos III e IV, e apresentarem fenótipos resultantes de defeitos em tais complexos mitigados, animais que expressam AOX tiveram fenótipos relacionados a diversas doenças complexas melhorados (ANDJEIKOVIĆ; KEMPPAINEN; JACOBS, 2016; DASSA et al., 2009; EL-KHOURY et al., 2016; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; JACOBS et al., 2023; KEMPPAINEN et al., 2014; RAJENDRAN et al., 2019). Por exemplo, moscas mutantes para o gene *dj-1 $\beta$*  (modelo para a doença de Parkinson) apresentam defeitos locomotores diminuídos na presença da AOX (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009), e linhagens que expressam peptídeos beta-amilóides humanos (modelo para a doença de Alzheimer) apresentam um aumento na longevidade, a qual na ausência de AOX é bem curta (EL-KHOURY et al., 2016). Até mesmo disfunções ontogenéticas, como o fenótipo de fenda torácica, correspondente ao fenótipo de lábio leporino em humanos foi prevenido quando a mosca se desenvolveu expressando AOX (ANDJEIKOVIĆ; KEMPPAINEN; JACOBS, 2016). Em camundongos, a expressão de AOX os protege da letalidade induzida por estimulação inflamatória por lipopolissacarídeo (LPS), uma condição similar à sepsse,

o que favorece o seu uso também para melhor entendimento de processos inflamatórios (MILLS et al., 2016). AOX também é capaz de atenuar efeitos da fumaça de cigarro no tecido pulmonar de animais expostos por nove meses a tal condição, diminuindo a destruição e a perda de função tecidual (GIORDANO et al., 2019). Um fenótipo de cardiomiopatia letal resultante de uma deficiência no CIII, também foi prevenido pela AOX, gerando animais viáveis e com sobrevivência estendida. Outros fenótipos resultantes da mesma deficiência foram evitados por essa enzima, incluindo astrogliose cerebral e atrofia tubular renal, com exceção da doença hepática e também a lipodistrofia, sugerindo funções tecido-específicas da AOX (RAJENDRAN et al., 2019).

Por outro lado, disfunções mitocondriais resultantes de mutações que levam a falhas na replicação do DNA mitocondrial (RODRIGUES et al., 2018) ou na síntese proteica intra-mitocondrial não são amenizadas pela AOX (KEMPPAINEN; KEMPPAINEN; JACOBS, 2014), e até mesmo efeitos negativos da expressão AOX também já foram reportados. Em *D. melanogaster*, apesar da reprodução ocorrer normalmente entre machos e fêmeas que expressam AOX, um estudo mostrou que os machos apresentam desvantagem quando testados em competição de espermas com machos controles, e isso é decorrente de uma acumulação ineficiente de espermatozoides maduros na vesícula seminal (SAARI et al., 2017). O desenvolvimento de linhagens de moscas que expressam altos níveis de AOX em condições de restrição nutritiva de carboidratos também é comprometido, com letalidade na fase de pupa, possivelmente por não estocarem recursos nutricionais suficientes para a metamorfose (SAARI et al., 2019a, 2019b). Em camundongos, fenótipos de miopatia severa são agravados pela AOX, a qual causa diminuição na longevidade e problemas de regeneração das fibras musculares, dentre outros efeitos (DOGAN et al., 2018).

Ademais, apesar de a AOX se mostrar inócua, não alterando significativamente o metabolismo e a fisiologia de animais que a expressam sem nenhuma deficiência/fenótipo deletério e em condições favoráveis de nutrientes e temperatura, sabemos que alterações metabólicas provocadas por variação na dieta ou temperatura podem influenciar a organização dos complexos respiratórios alterando o equilíbrio NADH:FADH<sub>2</sub> (GUARÁS et al., 2016), as atividades enzimáticas do ETS e/ou a fluidez da membrana interna mitocondrial (DANIEL et al., 2008; FARKAS, 1984; QUINN, 1988), resultando em respostas distintas no organismo para lidar com tais

condições. Por exemplo, moscas alimentadas com quantidades elevadas de ácidos graxos poli-insaturados demonstram maior resistência ao frio, favorecendo a remodelação das membranas mitocondriais necessária diante da exposição a baixas temperaturas (GOTO et al., 2010; HOLMBECK; RAND, 2015). Esses são ajustes cruciais para a manutenção da homeostasia celular e tecidual, frequentemente dependentes de sinalizações retrógradas e anterógradas entre mitocôndrias e outros compartimentos celulares, podendo ser influenciadas positiva ou negativamente pela atividade de AOX. No que diz respeito ao estresse térmico, foi mostrado que AOX causa ameniza os efeitos do frio, causando aceleração no desenvolvimento de *D melanogaster*, com efeito pronunciado sobre a fase larval, as quais alcançam o estágio de pré-pupa em média até 10 dias antes a 12 °C do que as larvas controle, além de apresentarem maior viabilidade, sendo esse efeito dose-dependente, isto é, quanto mais AOX, maior aceleração e maior viabilidade. Essa EA também confere maior resistência ao frio em moscas adultas, as quais são capazes de se recuperar após um coma gerado pela exposição ao frio de 4 °C por um período tão longo quanto de 12 dias, que causou morte de cerca de 90 % das moscas controle. Mesmo após um período mais curto de exposição (15 h), as moscas que expressam AOX se recuperaram 100 % antes, em um tempo de no máximo 45 min. Somados a esses efeitos, a perda de peso precoce de peso detectada em moscas jovens adultas que expressam AOX em altos níveis, despertam interesse para o estudo do potencial termogênico inerente à atividade da AOX e os possíveis desdobramentos que isso causaria em diferentes condições metabólicas e/ou tecidos humanos.

Em conjunto, esses diversificados efeitos da AOX demonstram ainda possíveis limitações da aplicação da enzima para o tratamento de doenças humanas, muito provavelmente envolvidos com a diversidade das funções realizadas pelas mitocôndrias dentro da célula. Fica explícita a necessidade de estudos minuciosos em metazoários, incluindo a investigação a respeito da perda evolutiva do seu gene em mamíferos e insetos. Busca-se, portanto, melhor entendimento acerca dos processos biológicos básicos influenciados/alterados pela expressão da AOX, objetivando a construção de uma base sólida para o avanço de ferramentas terapêuticas, envolvendo não apenas essa enzima, mas também mecanismos bioquímicos nos quais ela se envolve.

### 3.2.6 Dinamicidade do ETS: interações e formação de supercomplexos

O ETS mitocondrial é dinâmico, contribuindo aos ajustes mitocondriais para o suprimento das necessidades celulares, e dentro deste contexto, não podemos desconsiderar os mecanismos nos quais a AOX participa. Uma adaptação metabólica interessante ocorre em *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, que apresenta duas formas ao longo do seu ciclo de vida, sendo a primeira de metabolismo oxidativo, denominada pro-cíclica e encontrada no intestino da mosca tsé-tsé do gênero *Glossina*. (DOLEŽELOVÁ et al., 2020) . A segunda é a forma sanguínea, que adentra a corrente sanguínea humana com a picada da mosca, possui metabolismo glicolítico, e apresenta um ETS truncado, com ausência dos complexos III e IV, composto basicamente por AOX e mGPDH, ambas não bombeadoras de prótons. Neste caso, essas enzimas interagem funcionalmente, criando um ciclo fútil de prótons, já que não contribuem para o  $\Delta\Psi_m$ , formando um ETS cuja principal função não é a produção de ATP, mas sim a manutenção do balanço redox, permitindo a reoxidação de NADH e o funcionamento da glicólise. A ATP-sintase, nesta circunstância, opera em seu modo reverso, gerando  $\Delta\Psi_m$  através da hidrólise de ATP, e controlando os níveis de ATP celular, o qual inibe a AOX nesse sistema. Até mesmo as mitocôndrias são reestruturadas morfológicamente, apresentando um formato peculiar, tubular, no qual faltam invaginações (DOLEŽELOVÁ et al., 2020; SZIBOR et al., 2022). A interação funcional entre AOX e GPDH também já foi sugerida em plantas, com funções relacionadas ao balanço redox também (DULERMO; NICAUD, 2011).

Além da regulação sobre a diversidade de desidrogenases que atuam conectando as diversas vias metabólicas, os complexos CI, CIII e CIV podem não se distribuir aleatoriamente na membrana interna mitocondrial, como representado na Figura 2. Eles interagem entre si, formando estruturas quaternárias, os SC, os quais são muito comuns em mamíferos e podem ocorrer de três maneiras coexistentes com base nas interações do CIV (LAPUENTE-BRUN et al., 2013; SCHAGGER, 2000): 1) formando o chamado respirassomo com CI e CIII, que otimiza a transferência de elétrons provenientes de NADH; 2) interagindo apenas com CIII, possivelmente recebendo elétrons das desidrogenases associadas ao FADH<sub>2</sub>; ou 3) com CIV livres que recebem elétrons do SC I-III ou de CIII livres (SCHAGGER, 2000). As funções

dos SC são ainda muito discutidas e não totalmente claras, mas considera-se que eles se relacionem principalmente à diminuição do estresse oxidativo, aumento da eficiência catalítica e/ou da estabilização dos complexos na membrana interna (MILENKOVIC et al., 2017; SCHAGGER, 2000). Alterações na formação destas estruturas são observadas em doenças mitocondriais, mas não é possível afirmar ainda se isso contribui às perdas de funções da organela e ao desenvolvimento das patologias (MILENKOVIC et al., 2017)

A configuração dos SC pode variar de acordo com a disponibilidade de nucleotídeos reduzidos. Por exemplo, a oxidação da glicose gera uma alta proporção de NADH em relação à FADH<sub>2</sub>, criando uma maior demanda para o CI, enquanto a oxidação de ácido graxo gera uma razão NADH:FADH<sub>2</sub> menor, aumentando o fluxo de elétrons através de FAD. Neste último caso, as CoQ reduzidas pela ETF:Q oxidoredutase acumulam-se podendo estimular a dissociação do SC I-III, tornando o CIII mais disponível aos elétrons provenientes do FADH<sub>2</sub> (GUARÁS et al., 2016; SPEIJER, 2011). Portanto, dependendo do tipo do substrato aos componentes do ETS predominante, a taxa CoQH<sub>2</sub>/CoQ varia e pode contribuir para uma reconfiguração dos SC respiratórios, facilitando a transferência dos elétrons que chegam em proporções variáveis a partir de NADH e FADH<sub>2</sub> (GUARÁS et al., 2016).

É importante pontuar que a organização supramolecular do ETS mitocondrial não parece ser conservada entre os diversos grupos de organismos. Em *D. melanogaster*, apesar da alta demanda energética, principalmente para o voo em adultos, estudos mostram uma baixa quantidade de SC em seus tecidos. A capacidade de manter o processo de transferência de elétrons eficiente e sem maiores danos é relacionada possivelmente com a composição da MIM, rica em fosfatidiletanolamina com ácido palmitoleico, o qual é mais resistente à oxidação do que ácidos poli-insaturados, componentes mais comuns da MIM (SHIMADA et al., 2018). Por outro lado, um estudo ainda em revisão, aponta que a o *knockout* de um gene que causa falhas no processo de montagem do CIV, aumenta a formação de SC I-III, indicando que essas formações se relacionam muito com a estabilidade do sistema também, tendo funções que parecem ser mais estruturais do que catalíticas (BRISCHIGLIARO et al., 2023). Além disso, uma avaliação mais profunda, que considere a fase larval, cujo programa metabólico é bastante diferente dos adultos, se faz necessária.

### 3.3 A influência da temperatura e termorregulação em animais

A temperatura, em conjunto com a disponibilidade de oxigênio e água constituem os principais fatores abióticos que moldam a evolução da vida na Terra, de tal forma que a variação de tais fatores ao longo dos mais diversos ambientes, leva também à variação da forma como os organismos lidam com isso, adaptam-se e diversificam-se (BENNETT et al., 2021; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; KLEPSATEL et al., 2016). É sabível que átomos e moléculas se movimentam constantemente, porém, quanto maior a temperatura, maior é a intensidade dessa agitação e vice-versa. (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

As reações químicas, principalmente as enzimáticas, são dependentes da temperatura, sendo que as baixas as desaceleram ou vice-versa, mas as extremas são capazes de desnaturar as proteínas, levando a perda de funções (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000). As membranas celulares também são muito afetadas pela variação térmica, que altera a sua fluidez e impacta algumas funções celulares, incluindo o transporte e a permeabilidade celular, além de outros processos essenciais já que, além da membrana plasmática, várias organelas de eucariotos são envoltas por membranas, inclusive a mitocôndria (FARKAS, 1984; HAZEL, 1995; QUINN, 1988).

Nesse sentido, quando submetidos a temperaturas que extrapolem o espectro ótimo, os organismos sofrem estresse térmico, gerando respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas para se adequarem à mudança imposta. Os endotérmicos, que usam fontes de calor endógenas para termorregulação, e são capazes de manter a temperatura do corpo constante mesmo sob oscilações térmicas ao seu redor, mas isso demanda um gasto energético. Já os ectotérmicos, que usam fontes de energia externas ao organismo para regular a temperatura corporal, estão sujeitos a alterações na taxa metabólica correspondentes às flutuações de temperaturas do ambiente (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000). É importante ressaltar que o calor é subproduto da maioria das reações energéticas do organismo, mas nos ectotérmicos a produção de calor ocorre em taxas muito menores do que nos endotérmicos, e a condutância térmica é alta em seus corpos é alta, o que não os permite aquecer o próprio corpo com o calor produzido (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000).

Entretanto, em resposta à variação térmica de 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 aclimatação). A mitocôndria é uma das principais organelas que atuam em animais para que a capacidade aeróbica seja ajustada nesse contexto (GUDERLEY, 2004; SEEBACHER, 2005; ST-PIERRE; CHAREST; GUDERLEY, 1998). Por ser a principal responsável pela conversão de energia química e produção de calor, fatores de transcrição atuam mediando a biogênese mitocondrial e a expressão de genes atuantes em vias metabólicas, como a OXPHOS. Um exemplo é o papel que da proteína PGC-1 $\alpha$  que responde a estímulos, incluindo a temperatura, coordenando a biogênese mitocondrial e a expressão de proteínas que participam da oxidação de ácidos graxos e respiração mitocondrial (LIN; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2005)

Um fenômeno interessante ocorre no lagarto teiú *Salvator merianae* (Reptilia: Teiidae), vertebrado de aproximadamente 2 kg classificado como ectotérmico. Mesmo com seu baixo isolamento corporal, esse animal realiza endotermia sazonal, que ocorre em sua estação reprodutiva, sendo capaz de aumentar endogenamente sua temperatura corporal em torno de 6 °C em relação à temperatura do ambiente, enquanto se isola em uma toca (TATTERSALL et al., 2016). Já se conhecia o caso da cobra píton diamante, *Morelia spilota* (Reptilia: Boidae), que durante a incubação dos ovos, é capaz de aquecer-se por meio de tremor (SLIP; SHINE, 1988). Embora nem todos os mecanismos moleculares pelos quais isso acontece são conhecidos é evidente a importância da manutenção da temperatura para a reprodução (FARMER, 2016; TATTERSALL et al., 2016) (FARMER, 2016; TATTERSALL et al., 2016;). Na mesma linha, pode-se considerar até o que ocorre em plantas que aquecem seus órgãos florais, com importância reprodutiva (KNUTSON, 1974; WAGNER et al., 2008; WATLING; ROBINSON; SEYMOUR, 2006), assim como em abelhas que possuem mecanismos de termorregulação para manutenção da temperatura em colônias, processo importante para o desenvolvimento das larvas, as quais só se desenvolvem numa faixa estreita de temperatura (33 – 36 °C). Alguns indivíduos são capazes de produzir calor através do músculo do voo torácico e o número de indivíduos que realizam esse processo aumenta no ninho quando há resfriamento da colônia (STABENTHEINER; KOVAC; BRODSCHNEIDER, 2010).

Os insetos, são de fato organismos muito estudados para entender adaptações a condições térmicas extremas pois incluem grupos que se mantêm ativos em temperaturas tão baixas quanto  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (KOHSHIMA, 1984), bem como termorreguladores que ao voarem apresentam temperatura corporal acima daquela de vertebrados até então considerados os mais quentes já encontrados (HEINRICH, 1989, 1995) (HEINRICH, 1989; HEINRICH, 1995). Em *Drosophila*, foram identificados um conjunto de sensores moleculares análogos aos “canais iônicos receptores de potencial transitório” (do inglês, TRP) presentes em neurônios sensoriais de mamíferos que atuam na detecção de temperaturas altas e baixas, e que atuam na termorregulação e na modulação do metabolismo. Essas identificações demonstram que alguns mecanismos termorregulatórios são conservados entre os grupos ((DILLON et al., 2009; SOKABE; TOMINAGA, 2009; WANG; SIEMENS, 2015).

### 3.3.1 Produção de calor nos organismos

O calor pode ser definido como uma energia cinética molecular, resultante do movimento aleatório de átomos e moléculas que compõem uma determinada matéria (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Considerando a dinamicidade de um sistema biológico, é estabelecido que calor, energia e vida são indissociáveis pelas leis da termodinâmica. Uma vez que os organismos são sistemas abertos, porém altamente organizados, é necessária uma elevada entrada de energia de alta graduação para assegurar a manutenção das atividades vitais, o crescimento e a reprodução. São definidas como energia de alta graduação aquelas capazes de realizar trabalho, como energia química, mecânica ou elétrica (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; MACHEREL et al., 2021)

Os seres vivos, então, obtêm energia química através da alimentação ou fotossíntese (no caso dos produtores) e essa energia é convertida em trabalho biológico, isto é, contração muscular, transporte de íons etc. A degradação química das macromoléculas (catabolismo), resulta na regeneração da energia útil ao organismo (ATP), com consumo de  $\text{O}_2$  e liberação de calor, pois são reações em sua maioria exergônicas. Nesse sentido, o consumo de  $\text{O}_2$  pode ser utilizado para estimar taxa metabólica, que é a quantidade de energia gasta em determinado tempo, e essa taxa é negativamente correlacionada com a massa corpórea (MACHEREL et al., 2021; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000).

As transformações energéticas do metabolismo, que compreendem o conjunto de reações químicas que sustentam os processos vitais dos organismos, principalmente nos animais, não são totalmente eficientes, e acabam liberando energia de baixa graduação (calor). Considerando então, que o ATP é a moeda energética dos seres vivos, sob a perspectiva bioquímica, a produção de calor é relacionada com essa molécula de duas maneiras, podendo ser resultante do seu gasto, isto é das reações de hidrólise ou associada ao processo de síntese (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 caso, as contrações são muito ineficientes, não sendo aproveitada para trabalho, pois um conjunto de músculos antagonistas são ativados, causando apenas tremor, e liberando quase toda a energia da hidrólise do ATP como calor (BIANCO, 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012; MACHEREL et al., 2021; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000).

A produção de calor relacionada ao processo de síntese de ATP, especificamente a OXPHOS nos eucarióticos, é resultante da ineficiência termodinâmica desse processo, que embora varie entre os organismos, tecidos e contexto bioenergético, é relativamente alta, liberando quantidades significativas de calor. O cálculo da eficiência termodinâmica da OXPHOS é muito difícil de ser precisamente calculado, considerando as diversas variáveis, principalmente *in vivo*, mas é possível avaliar parâmetros respiratórios que são indicativos importantes. No geral, estima-se que 40 - 60 % da energia que entra no sistema (do inglês, *input*) seja liberada como energia de baixa graduação, ou seja, calor (MACHEREL et al., 2021). Tal ineficiência ocorre, principalmente, porque o processamento da energia pela OXPHOS não é perfeitamente acoplado à síntese de ATP, devido ao vazamento de prótons através da MIM, dissipando em forma de calor a energia que seria utilizada para realização de trabalho pela ATP-sintase para produzir ATP. Esse mecanismo é chamado de desacoplamento mitocondrial e constitui um dos tradicionais mecanismos termogênicos em animais (JASTROCH et al., 2010; NICHOLLS, 2021).

O vazamento protônico é classificado em dois tipos: o constitutivo, que ocorre por meio da condutância basal de prótons, dependente da composição de ácidos

graxos e da abundância de translocases de nucleotídeos de adenina (ANT) na MIM; e o regulado/induzido, no qual a condutância de prótons é catalisada por proteínas específicas, as desacopladoras (UCPs) (DIVAKARUNI; BRAND, 2012; JASTROCH, 2010). Diversas UCPs, já foram descritas (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5), e os seus papéis variam, não sendo todas protonóforas, mas atuam no transporte de metabólitos específicos, regulação do  $\Delta\Psi_m$  e do funcionamento da OXPHOS, sendo assim exploradas para entendimento de certas patologias e mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, a UCP1, a primeira a ser identificada e descrita, tem função primária de termogênese, por isso também ficou conhecida como termogenina. Ela é ativada por ácidos graxos e inibida por nucleosídeos di ou trifosfato, e encontrada em abundância no grande número de mitocôndrias que apresenta o tecido adiposo marrom de certos mamíferos, tornando-o especializado em produção de calor por meio da oxidação de moléculas de gorduras e OXPHOS ineficiente. Essa termogênese é crucial para a sobrevivência de mamíferos durante períodos frios e para manter a temperatura de recém-nascidos, até mesmo humanos (CANNON; NEDERGAARD, 2004; NELSON; COX, 2014; RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000). Basicamente, esse mecanismo é estimulado pelo frio ou superalimentação, através da inervação parassimpática que há no tecido adiposo marrom, levando a liberação de catecolaminas que irão ativar receptores específicos (adrenérgicos), desencadeando uma sinalização específica que afeta os níveis de UCP1, assim como a lipólise.

As UCPs são mais conhecidas e exploradas em mamíferos (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000), mas são amplamente distribuídas entre os grupos eucarióticos, incluindo artrópodes (SLOCINSKA et al., 2011; SLOCINSKA et al., 2012; DA-RÉ et al., 2014) e plantas (LALOI, et al. 1997), conforme mostram estudos com base em homologias de sequências. Entretanto, como vimos, nas últimas os principais mecanismos termogênicos já descritos ocorrem através da AOX e não por meio de UCPs. Em *D. melanogaster*, quatro UCPs foram identificadas (UCP4A, 4B, 4C e 5), e embora a maioria delas também não se envolvam diretamente com termogênese, a UCP4C já foi apontada com função de protonóforo, promovendo desacoplamento mitocondrial, e desempenhando papel essencial ao desenvolvimento das moscas em baixas temperaturas (15 °C). Diminuição nos níveis de expressão de UCP4C por meio de *knockdown* comprometeram o completo desenvolvimento das moscas, levando a uma redução drástica no número de larvas de terceiro instar (L3) e inatingibilidade da

fase adulta. Por outro lado, larvas L3 com expressão normal de UCP4C, apresentaram uma temperatura 0,5 °C acima do ambiente circundante a 14 °C, o que não aconteceu com as linhagens com *knockdown*. Mais uma vez, se demonstra a importância da glicólise para a produção de ATP durante as fases larvais, com a OXPHOS apresentando, dentre outras funções, a de desacoplar as mitocôndrias e auxiliar o desenvolvimento. Acredita-se que este mecanismo tenha evoluído como uma resposta adaptativa para promover o desenvolvimento larval em temperaturas baixas, já que elas são menos móveis que adultos, e passam muito tempo confinadas em nichos específicos (DA-RÉ et al., 2014).

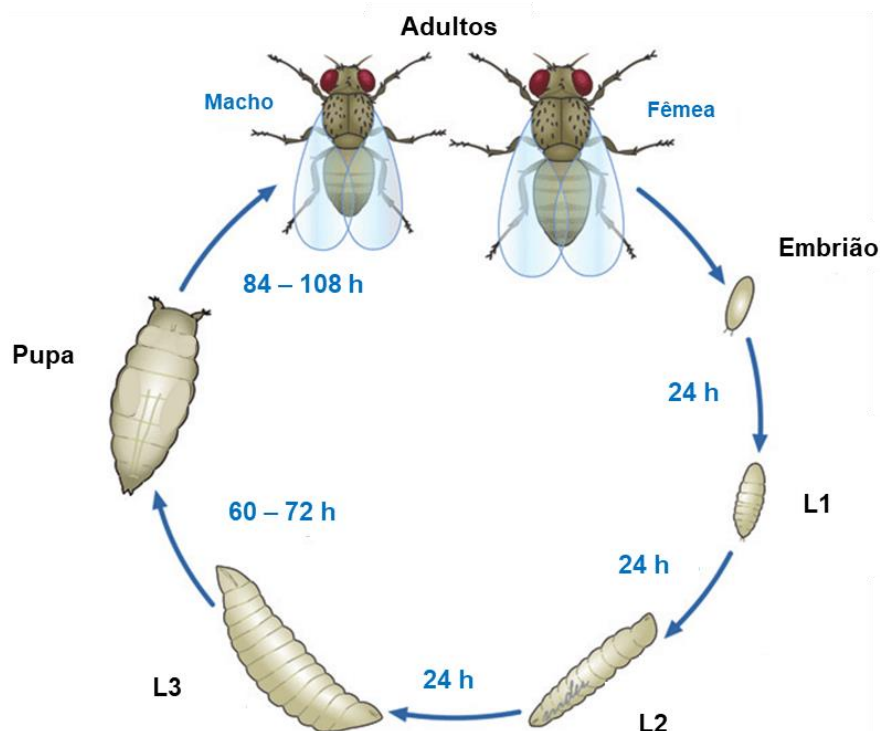
### **3.4 Uso de *Drosophila melanogaster* como organismo-modelo**

Ao longo dessa revisão, é possível notar que *D. melanogaster* exerce certo protagonismo no âmbito das investigações científicas dentro dos mais diversos tópicos da biologia. Esse inseto da ordem *Diptera*, pequeno, com aproximadamente 2 mm de comprimento, tem sido usado sistematicamente desde os primórdios do século passado para o entendimento de diversos processos, proporcionando avanços notáveis em diferentes áreas, em conjunto com o aprimoramento de técnicas de biologia celular e manipulação genética (BRANDT; VILCINSKAS, 2013; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007; GARCIA et al., 2021; JEIBMANN; PAULUS, 2009). Trabalhos com *D. melanogaster* renderam 6 Prêmios Nobel de Fisiologia ou Medicina a 11 cientistas até a presente data, por achados em áreas como genética, biologia do desenvolvimento e fisiologia (“Flying Through History: Nobel Prizes for Fruit Fly Research (Part 1) – Future Fields”, [s.d.]). A partir do ano 2000, o completo sequenciamento do genoma da *D. melanogaster*, revelou a presença de genes ortólogos aos dos mamíferos, tais como os que codificam proteínas mitocondriais, concretizando a sua relevância sob a ótica da evolução e destacando sua aplicabilidade como organismo modelo, com importância biomédica (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007; GARCIA et al., 2021).

O ciclo de vida breve (Figura 3) e os aspectos reprodutivos da *D. melanogaster* tem propriedades que favorecem sua versatilidade biológica. O seu desenvolvimento é caracterizado por fases de desenvolvimento bem definidas, e a sua elevada fecundidade permite a obtenção fácil e rápida de uma população. Cada fêmea é capaz de colocar aproximadamente 100 ovos diariamente, os quais passam por um processo

de embriogênese de aproximadamente 24 h a 25 °C, compreendendo 17 estágios (CAMPOS-ORTEGA; HARTENSTEIN, 1985; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007). Após o último estágio embrionário, o embrião eclode, originando a fase larval em seu estágio de primeiro instar (L1). As larvas L1 alimentam-se na superfície do meio onde os ovos foram depositados, crescendo de maneira a atingir o estágio de segundo instar (L2) após aproximadamente mais 24 h. Subseqüentemente, adentram o meio de cultivo, onde se alimentam intensamente até alcançarem o estágio seguinte, L3. Algumas características morfológicas permitem a diferenciação desses estágios, além do tamanho, que pode ser arbitrário, dependendo do que se estuda. Por exemplo, L2 e L3 são facilmente distinguidas através da observação microscópica dos seus espiráculos (Figura 4), os quais apresentam ramificações na porção anterior em L3 (POÇAS; DOMINGOS; MIRTH, 2020).

Figura 3 - Ciclo de vida simplificado da *Drosophila melanogaster*

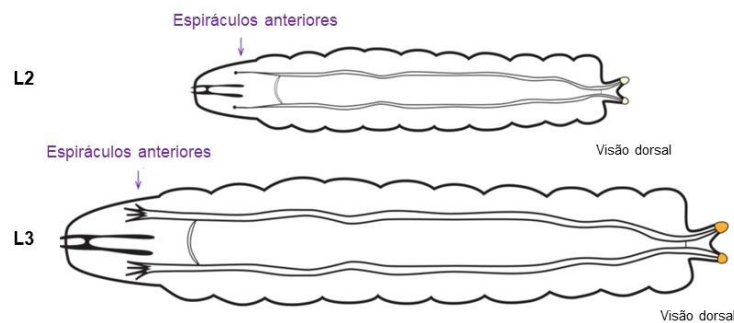


Esquema mostrando as principais fases de desenvolvimento, com o tempo médio de cada uma a 25 °C, totalizando 10 – 12 dias de embrião até adulto. L1, larva primeiro instar; L2; larva de segundo instar; L3, larva de terceiro instar. Fonte: reproduzido e adaptado de Ong et al. (2015, p.2).

Quando as larvas L3 atingem a maturidade, elas deixam o meio, procurando um substrato seco – no contexto laboratorial, geralmente a parede do recipiente de

cultivo – para posterior empupamento. Neste estágio, elas são denominadas L3 errantes, e em um período de 24 - 48 h, elas se tornam imóveis, sendo já pré-pupas com uma coloração semelhante da larva, branco-amarelado. A partir de então, após prossegue-se a fase de pupa, no qual a larva vai se metamorfoseando. Com o tempo a pupa vai se tornando progressivamente mais escura, com coloração amarronzada, até se possível observar a formação da mosca adulta no seu interior (imago). A duração aproximada dessa fase é de 100 h com 15 estágios distintos, identificados de P1 a P15, cujos detalhes não serão aprofundados aqui. Após atingirem P15, as moscas emergem, resultando em um tempo médio de desenvolvimento, desde o ovo até a fase adulta, de 10 a 11 dias. O organismo adulto, pode viver por aproximadamente 10 semanas, o que o torna viável para estudos de longevidade. (BAINBRIDGE; BOWNES, 1981; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007; TYLER, 2000)

Figura 4: Diferenciação morfológica entre larvas de segundo (L2) e terceiro instar (L3) de *Drosophila melanogaster*



Representação esquemática de uma visão em microscópio, evidenciando a ramificação da porção posterior dos espiráculos em L3. A coloração mais evidente da porção posterior dos espiráculos também é uma característica da passagem para L3, porém, menos distinguível. Crédito da ilustração: Marisa Oliveira. Fonte: reproduzido de Poças et al. (2020, p.11).

As larvas, portanto, armazenam substancial energia, apresentando um crescimento acelerado, que é sustentado por um metabolismo predominantemente glicolítico, utilizando glicólise aeróbica para a produção da maior parte do ATP. Aproximadamente 12 h antes do término da embriogênese, é desencadeada uma "programação metabólica" controlada pelo receptor relacionado ao estrogênio de *Drosophila* (dERR), que desempenha um papel crucial sobre a regulação transcricional de vários genes que codificam enzimas envolvidas na glicólise, de modo

que mutantes para esse gene morrem em L2, com um acúmulo de açúcares circulantes e baixos níveis de ATP. Essa programação leva então a uma eficiente conversão de carboidratos em biomassa, semelhantemente a tecidos proliferativos. Uma vez que o *dERR* é ortólogo ao *ERR* humano, o desenvolvimento de *Drosophila* desperta interesse para o entendimento da regulação do câncer em humanos, principalmente considerando as limitações associadas a estudos com células em cultura que não possibilitam respostas sistêmicas. Além disso, as larvas também produzem e acumulam naturalmente altas concentrações de um enantiômero do oncometabólito 2-hidroxioglutarato (2-HG), favorecendo-as ainda mais como um modelo animal valioso para a exploração genética e metabólica do crescimento e proliferação celular (DRUMMOND-BARBOSA; TENNESSEN, 2020; LI et al., 2017; TENNESSEN et al., 2011, 2014; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). É relevante destacar que a mitocôndria desempenha uma função vital nesse contexto, assegurando a geração de precursores para vias biossintéticas, pois há a necessidade de reoxidação de carreadores de elétrons para o funcionamento do ciclo do TCA, que fornece precursores utilizados na biossíntese de lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (JACOBS; GEORGE; KEMPPAINEN, 2020; WANG; MA; QIAN, 2021).

A *D. melanogaster* também se apresenta como uma ferramenta importante para estudos de termorregulação (DILLON et al., 2009) em conjunto com estudos que envolvem neurobiologia, regulação e expressão gênica, longevidade, comportamento e genética de populações (BRANDT; VILCINSKAS, 2013; DILLON et al., 2009; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2007). Embora haja facilidade para monitoramento e medição da temperatura corpórea em experimentos conduzidos com ectotérmicos como répteis, algumas limitações são recorrentes, tais como a dificuldade para correlacionar a termorregulação com a aptidão e inferência do valor adaptativo de certos comportamentos, sendo desafiador a obtenção de um estudo a nível populacional e ao longo do tempo. Nesse contexto, a *D. melanogaster* torna-se uma opção atrativa, dadas suas características de desenvolvimento, que aliás, é diretamente influenciado pela temperatura, e facilidade de manipulação genética, com várias bases neurobiológicas da sensação térmica, assim como respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas à variação térmica bem caracterizadas (CHEN et al., 2014; DILLON et al., 2009; KLEPSATEL; WILDRIDGE; GÁLIKOVÁ, 2019; SOKABE; TOMINAGA, 2009). Portanto, em conjunto com a variedade de ferramentas moleculares disponíveis atualmente, diversos aspectos

reforçam ainda mais a *D. melanogaster* como um sistema biológico chave para as mais diversas investigações em metazoários.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens e cultivo

As linhagens de moscas utilizadas foram originalmente cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Howard T. Jacobs (Universidade de Tampere, Finlândia). A linhagem *w<sup>1118</sup>* foi usada como linhagem controle. A linhagem *3xtubAOX* (principal linhagem experimental do deste trabalho) possui 3 cópias do transgene da AOX proveniente de *C. intestinalis* sob controle do promotor de expressão constitutiva do gene da  $\alpha$ -tubulina (*Drosophila  $\alpha$ Tub84B*) com as construções genéticas inseridas nos cromossomos X, 2 e 3, no background genético *w<sup>1118</sup>* (KEMPPAINEN et al., 2014; SAARI et al., 2017). Especificamente para uma parte das análises de metabolômica foram incorporadas duas linhagens que expressam AOX sob o mesmo sistema de expressão, porém em níveis relativamente baixos por apresentarem apenas uma cópia do transgene da AOX: *tubAOX<sup>35</sup>* e *tubAOX<sup>7</sup>* cujas construções genéticas estão inseridas no cromossomo X e 3, respectivamente (KEMPPAINEN et al., 2014;

O cultivo das moscas foi feito com temperaturas (25 ou 12 °C) e fotoperíodo (12 h / 12 h de claro/escuro) controlados, em dieta padrão do Laboratório de Biologia Mitocondrial do Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, composta por 3,5 % de extrato de levedura (p/v), 3 % de glicose, 3 % de melaço, 1,5 % de sacarose, 1,5 % de farinha de milho, 1 % de farinha de soja, 1 % de gérmen de trigo, 1 % de ágar, 0,5 % de ácido propiônico e 0,1 % de nipagin (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009).

Para a maioria das análises descritas, frascos contendo aproximadamente 6 ml de dieta, 20 moscas fêmeas e 10 machos foram deixados por 12 h a 25 °C para cruzamento e oviposição. Após esse tempo, as moscas adultas foram descartadas e os embriões se desenvolveram a 25 ou a 12 °C até atingirem o estágio de larva L3 errante. Os organismos foram coletados aleatoriamente e ainda estavam em atividade (percorrendo a parede do frasco).

### 4.2 Mensuração da temperatura corpórea

Uma câmera termográfica sensível à radiação infravermelha (Flir SC660; Suíça) pertencente ao laboratório da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia Cardoso Bicego, 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 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 s por um período de 1 h. Os dados foram analisados com auxílio do software *Therma Cam Researcher 2.10*.

### 4.3 Atividade e mobilidade larval

Para mensurar a atividade larval, inicialmente, um calorímetro de fluxo contínuo foi modificado pelo Dr Johannes Lerchner, pesquisador associado à Universidade Tecnológica Bergakademie Freiberg da Alemanha, a partir de versões já descritas (HARTMANN et al., 2014; WOLF et al., 2015). Basicamente, o equipamento é caracterizado pelo uso de um chip de silício com termopilhas cercadas por dois termostatos, que servem como detector de potência térmica. Devido à sua baixa constante de tempo térmica (24 s), mudanças de curto prazo na taxa de produção de calor podem ser identificadas e a intensidade da agitação das larvas pôde ser quantificada pelo desvio padrão obtido através do ruído no sinal.

As larvas, já pesadas, em tampão de PBS (1%) foram posicionadas em seguimentos, entre dois nós de uma fibra de poliamida de 0,2 mm, que servia para o transporte das amostras por um canal de fluxo do calorímetro (diâmetro interno de 1,8 mm). Cada experimento foi composto por duas larvas, para as quais medidas foram obtidas sequencialmente em ciclos com duração de aproximadamente 18 min cada. Um segmento contendo um material inerte esponjoso foi utilizado como referência. Foram amostrados 6 – 12 indivíduos em pelo menos experimentos independentes.

Ensaio de mobilidade foram adaptados (NICHOLS; BECNEL; PANDEY, 2012) e os detalhes estão descritos por Garcia et al., 2021 . As larvas foram lavadas por 5 s em água deionizada e colocadas em placas de Petri com ágar a 2 %, sobre as quais, permaneceram por 5 min para aclimação em ambiente a 25 °C. Para o primeiro teste, as placas foram posicionadas sobre papel milimetrado (0,2 cm<sup>2</sup>) e a mobilidade larval foi quantificada pela contagem do número de linhas cruzadas / min por larvas

individuais, ao se locomoverem pela superfície do ágar. Já no segundo teste, através da observação em um microscópio estereoscópico foi contado o número de contrações peristálticas por min (o movimento completo da porção anterior para posterior é equivalente a uma contração). Foram amostradas 10 larvas a 25 e 12° C (repetições biológicas) e para cada uma delas as medições de linhas cruzadas ou contrações peristálticas/min foram repetidas por 10 - 15 vezes (repetições técnicas).

#### **4.4 Avaliações de biomassa e teor de gorduras e proteínas totais**

Para quantificar a massa corporal total (massa fresca), os indivíduos foram coletados aleatoriamente com o uso de uma pinça, lavados em água deionizada, secos em lenços Kimwipes® por aproximadamente 10 s, e então colocados, em grupos de 10 indivíduos, em microtubos (1,5 ml) previamente pesados e identificados para pesagem em balança de precisão com acurácia de 0,0001 g (Shimadzu, ATX224). Os pesos dos microtubos foram anotados em 2 etapas: vazios e com 10 larvas frescas, de forma que a massa total das larvas foi obtida através da subtração do peso do microtubo vazio.

Para quantificação da massa seca, foi feita a terceira etapa de pesagem após os microtubos contendo as mesmas amostras terem sido submetidos a um banho seco com as tampas abertas a 65 °C por pelo menos 2 h até a estabilização do peso das amostras, permitindo assim o cálculo de massa seca do conjunto de 10 larvas. Foram executadas 3 repetições biológicas compostas por 24 - 30 microtubos com 10 larvas, sendo a amostragem total ~800 indivíduos de cada linhagem. Todos os valores de massa total e massa seca foram divididos por 10, gerando uma média por larva individual.

Para extração de gorduras, as amostras foram incubadas com 1 ml de éter etílico por 24 h e isso foi repetido por 3 vezes (3 trocas de éter a cada 24 h). Finalmente, o éter foi descartado e as amostras foram novamente submetidas à secagem a 65 °C, como descrito anteriormente. As larvas secas e sem gordura foram retiradas dos microtubos originais, uma vez que a incubação do éter altera o peso original dos tubos, e novamente pesadas em um microtubo novo. Esta etapa de pesagem permitiu averiguar a massa magra e conseqüentemente a quantidade em mg de gorduras (“valor de massa seca” – “valor de massa magra”).

Para estimativas do teor de proteína total, foram coletados conjuntos de 20 larvas, enxaguadas em água deionizada, cuidadosamente secas em lenços Kimwipes®, como descrito anteriormente, e homogeneizadas no gelo com 1 ml de tampão de isolamento (250 mM de sacarose, 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EGTA, pH 7,4) usando um homogeneizador de vidro. A quantificação total de proteínas foi obtida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e o teor de proteína larval individual foi calculado do valor total dividido por 20, e os valores finais foram obtidos pela média de 14-15 experimentos independentes. Uma vez calculados o teor proteico e a massa magra individuais, estabeleceu-se a razão proteína/massa magra.

#### 4.5 Tamanho larval

As larvas foram coletadas individualmente com o uso de uma pinça, enxaguadas em água deionizada e cuidadosamente imersas em água quente (~80 °C) por aproximadamente 3 s para completa imobilização e distensão do seu corpo. Após serem brevemente secas em Kimwipes®, elas foram então fotografadas por um microscópio com câmera acoplada e as imagens foram analisadas no programa *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>), onde o tamanho foi estimado através da extensão do comprimento e da largura do corpo larval, representadas por linhas longitudinal e transversal. Foram amostradas pelo menos 72 larvas de cada linhagem em cada temperatura testada, sendo 3 repetições biológicas contendo 24-28 indivíduos cada.

#### 4.6 Ingestão alimentar

Para estimar o consumo de comida, um experimento foi adaptado de (KAUN et al., 2007). Larvas de 84 – 90 h pós oviposição cultivadas a 25 °C foram coletadas, lavadas brevemente em água deionizada e colocadas em jejum por 3 h em placas de *Petri* forradas com lenços umedecidos com 1 % PBS. Após o jejum, foram colocadas em placas contendo uma pasta de levedura corada de azul por 5 min. Ao serem retiradas, foram imediatamente imobilizadas por 5 s em água quente (~80 °C), tornando-se estiradas e fotografadas em posição ventral através de um microscópio com câmera acoplada. As imagens foram analisadas através do *Image J* para cálculo da razão área azul / área total da larva.

A pasta de levedura foi preparada com fermento biológico seco e corante *Brilliant Blue R* (0,7 % p/p corante/fermento) em água (32, 5 % p/v). É importante

dissolver a quantidade de corante inicialmente em uma pequena parte do volume de água (~3 % do volume total de água) e preparar a pasta com o restante de água, juntando-os depois, para que a pasta fique corada uniformemente.

#### 4.7 Avaliação da fisiologia mitocondrial

A fisiologia mitocondrial foi avaliada através de medidas de consumo de oxigênio tempo real, utilizando-se o sistema de respirometria de alta resolução Oxygraph-2k (*O2k, Oroboros Instruments*), de acordo com Garcia et al. (2021). As amostras consistiram em homogeneizados totais de larvas L3 errantes (desenvolvidas a 25 ou a 12 °C) preparados em 1 ml de tampão de isolamento (250 mM sacarose, 5 mM Tris HCl, 2 mM EGTA, pH ajustado a 7,4). Após lavagem das câmaras, foram adicionados 1800 ou 1900 µl de tampão de ensaio (120 mM KCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 % BSA, pH ajustado a 7,4) a 750 rpm para calibração à temperatura experimental. Uma vez estável o sistema, 100 ou 200 µl da amostra foram adicionados ao tampão de ensaio e as câmaras fechadas. Corridos 10-20 min, iniciou-se a adição dos substratos/inibidores às vias do ETS analisadas: 5 µl 2 M piruvato (concentração final de 5 mM) e 7,5 µl 0,4 M malato (1,5 mM) para o CI; 80 µl 0,65 M glicerol-3-fosfato (26 mM) para mGPDH. A avaliação exclusiva da respiração mantida por mGPDH foi feita na presença de 1 µl de 0,01 M rotenona (0,005 mM).

Para o estado de OXPHOS (P), a respiração foi medida após adição de 4 µl 0,5 M ADP (1 mM); para o estado de LEAK (L), adicionou-se 1 µl 25 µM oligomicina (12,5 nM), inibindo a ATP-sintase; e para atingir o consumo de oxigênio suportado pela capacidade máxima de transferência de elétrons (do inglês, ET-capacity, E), foi feita titulação de 1 µl de 8 mM carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP, 4 µM por dose).

Em cada estado mitocondrial, foi averiguada a respiração mantida exclusivamente pela AOX, adicionando-se 2 µl 0,05 M antimicina A (0,05 mM), inibidor do CIII. A AOX foi inibida com 2-4 µl de 0,1 M propilgalato (0,1-0,2 mM). Todos os valores de respiração foram calculados subtraindo-se o valor de respiração residual após inibição da AOX, CIII e do CI com 1 µl 0,01 M rotenona (0,005 mM). Todos os valores de respiração foram normalizados pela quantidade de proteínas totais dos homogeneizados larvais, obtida pelo método de *Bradford*.

A taxa de limitação relativa do ETS pelo sistema de fosforilação, evidenciando o excesso de capacidade do ETS não utilizado para OXPHOS em cada condição foi calculada através da fórmula  $1 - (P/E)$  (GNAIGER, 2020). A ineficiência de OXPHOS, ou seja, uma medida de desacoplamento entre o consumo de oxigênio e a fosforilação do ADP, foi estimada através da  $L/P$  (do inglês, control-coupling ratio) (GNAIGER, 2020). Essa medida evidencia a proporção de respiração que é compensada apenas por vazamento de prótons, sendo ineficiente à produção de ATP.

#### **4.8 Análise de metabolômica baseada em espectrometria de massas por cromatografia gasosa**

A investigação quanto a abundância de metabólitos intermediários foi feita em colaboração com o Dr. Jason Tennessen a partir de espectrometria de massas por cromatografia gasosa (GC-MS), em um espectrômetro (*Agilent Technologies 5977B MSD- 7890 GC system*) acoplado com um amostrador automático, pertencente à “Mass Spectrometry Facility” da Indiana University (Bloomington). As análises procederam-se para dois estágios larvais: L3 errante (principal estágio investigado em todo o trabalho) e L2. A obtenção de L3 se deu como descrito na seção 4.1. Especificamente para a análise utilizando o estágio L2, 50 moscas fêmeas e 25 machos foram colocados em garrafas de cultivo acopladas a placas de cultura de tecidos (35 x 10 mm<sup>2</sup>) contendo meio composto pela dieta padrão. Após 4 h, as placas foram retiradas, tampadas e deixadas por aproximadamente 60 h para que os embriões atingissem o estágio de L2 médio a 25 °C. Cada estágio larval foi analisado com, no mínimo, 6 repetições biológicas para cada genótipo, compostas por 15 larvas para L3 e 25 para L2.

Após a coleta em 1% PBS mantido no gelo e centrifugação a 2000 rcf (4° C), as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e o processamento para extração, secagem e derivação dos metabólitos ocorreu exatamente como previamente descrito (LI; TENNESSEN, 2018). A derivação, basicamente, modifica quimicamente os metabólitos para aumentar a volatilidade e a estabilidade dos mais sensíveis ao calor. Para isso, após a secagem das amostras, estas foram ressuspensas em 40 µl de cloridrato de O-metoxilamina (MOX) a uma concentração de 40 mg/ml em uma solução de piridina, sendo incubadas por 1 h a 30°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 5 min a

20.000 rcf para a remoção de materiais particulados, e 25 µl do sobrenadante foram transferidos para um frasco de amostrador automático contendo um inserto microvolumétrico de vidro desativado de 250 µl. A seguir, foi realizada a adição de 40 µl de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida contendo 1% de trimetilclorosilano (MSTFA, Thermo Scientific; TS-48915), seguida por incubação por 1 h a 37°C com agitação. O passo subsequente envolveu a injeção automática das amostras, após a adição de 3 µl de uma solução padrão de éster metílico de ácido graxo, utilizada para calibração dos tempos de retenção, bem como para avaliação do desempenho do instrumento. A configuração específica utilizada foi detalhada por Li e Tennessen (2018). A identificação e quantificação dos metabólitos de interesse presentes no cromatograma foram realizadas utilizando os softwares Mass Hunter Qualitative e Mass Hunter Quantitative.

Os dados obtidos foram normalizados com base na massa da amostra e em padrão interno de ácido succínico-d4 presente a 2 µl/ 2 ml na solução de metanol 90 % utilizada para extração. Foi utilizado o *Metaboanalyst* 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) para análise de padrões metabólicos através do método de agrupamento não supervisionado PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), o qual decompõe os dados em componentes simples e permite averiguar se os grupos se distinguem quanto ao conjunto de metabólitos analisados, e para a construção de heat maps. Os dados passaram por transformação em log (base 10) e escala de Pareto (PANG et al., 2021).

#### **4.9 Análises estatísticas**

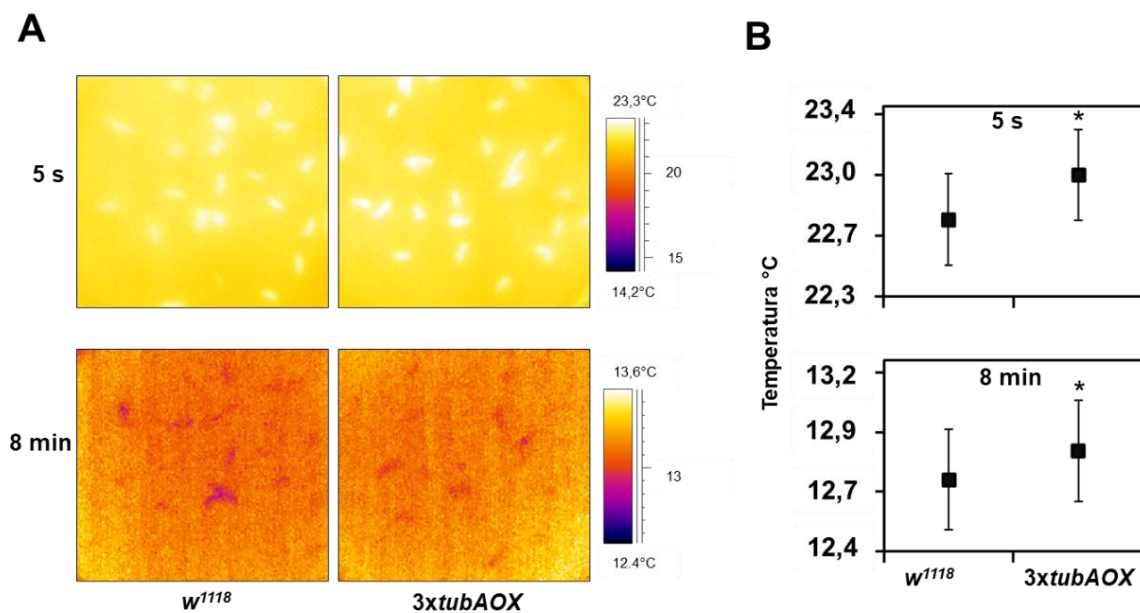
Os dados obtidos foram validados estatisticamente usando-se o software *Jamovi*. Testes t de *Student* foram executados para comparações entre as médias amostrais de dois grupos. Análises de variância (ANOVA) foram executadas para comparações entre 3 ou mais grupos. Diferenças apontadas por ANOVA foram identificadas par a par por testes *a posteriori* de Tukey.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 A temperatura larval é elevada na presença da AOX**

Considerando nossos dados já publicados, os quais sugerem que o aumento da viabilidade e a diminuição do tempo de desenvolvimento de larvas que expressam AOX (larvas AOX) em baixas temperaturas podem ser causados por termogênese (SAARI et al., 2019b), nós averiguamos por meio de termografia de infravermelho se a temperatura corpórea da larvas estaria aumentada devido à atividade da AOX no ETS larval. 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, equilibrando sua temperatura interna com o ambiente aos 12 °C em aproximadamente 8 minutos (resultados não apresentados). Nós detectamos uma diferença significativa na temperatura corpórea média das larvas durante este intervalo (Figura 5), tendo as larvas AOX temperaturas entre 0,1 e 0,2 °C mais elevadas do que as controles.

Figura 5 - Termografia de infravermelho mostra diferenças de temperatura corpórea entre as larvas controle e AOX

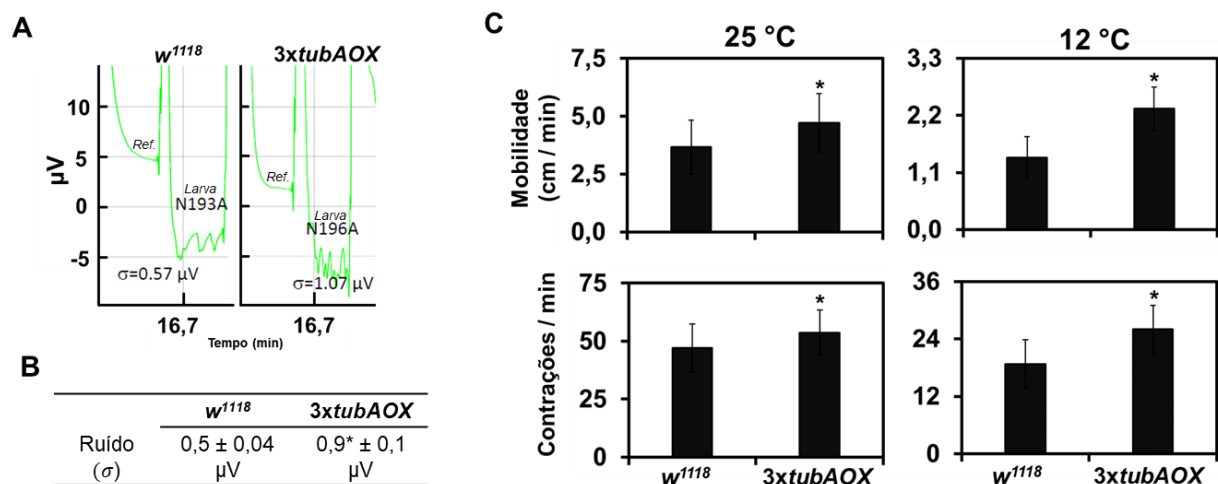


(A) Imagens obtidas após as larvas L3 errantes cultivadas a 25 °C serem submetidas a 12 °C por 5 segundos (5 s) e 8 minutos (8 min). (B) Temperatura média +/- desvio padrão de, pelo menos, 42 larvas de cada genótipo, calculada a partir de 3 repetições biológicas nos tempos indicados. \* representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o controle, de acordo com o teste t de *Student*.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Usamos também uma técnica que utiliza um calorímetro, adaptado para medições de pequenas amostras biológicas. Entretanto, a medição da taxa de produção de calor foi dificultada *in vivo* devido à intensa movimentação larval

detectada através do elevado ruído do sinal de voltagem, que foi aproximadamente 2X mais intenso nas larvas AOX (Figura 6A e B). Essa análise apontou que a AOX torna as larvas mais ativas, como hipotetizamos que ocorreria, em decorrência à geração de calor provocada pela enzima, capaz de aumentar a temperatura larval e conseqüentemente sua mobilidade, o que seria mais intenso numa condição de frio. Nós avaliamos, então, a atividade locomotora larval, por meio da medição da velocidade de deslocamento e do número de contrações peristálticas corpóreas após cultivo a 25 ou a 12 °C (Figura 6C). A 25 °C, uma condição considerada não estressante, verificamos que as larvas AOX são significativamente mais ativas, locomovendo e contraindo-se ~30 e 15 % mais, respectivamente (Figura 6C). A 12 °C, o efeito da AOX foi mais pronunciado, levando a um aumento de ~70 % na mobilidade e de ~40 % no número de contrações corpóreas (Figura 6C).

Figura 6: Atividade larval medida através de diferentes abordagens em indivíduos L3 errantes controle e AOX



(A) Gráfico representativo mostrando o sinal em  $\mu$ V estável obtido por uma amostra amorfa, usada como referência (Ref) e com evidentes oscilações (ruído,  $\sigma$ ), cujos valores indicam atividade para um indivíduo pertencente ao grupo controle (N193A) e para uma larva AOX (N196A). (B) Média de  $\sigma$  +/- desvio padrão de 6-10 indivíduos obtidos em duas repetições biológicas para os genótipos indicados. (C) Velocidade de locomoção (mobilidade em cm/min) e contrações da parede corporal da larva averiguadas a 25 e a 12 °C calculadas como descrito nos Materiais e Métodos. Os dados representam médias +/- desvio padrão de 10 réplicas biológicas com 10-15 repetições técnicas cada. \* indica diferenças estatísticas em relação ao controle ( $p < 0,05$  de acordo com o teste t de *Student.*). Fonte: Elaborado pela autora

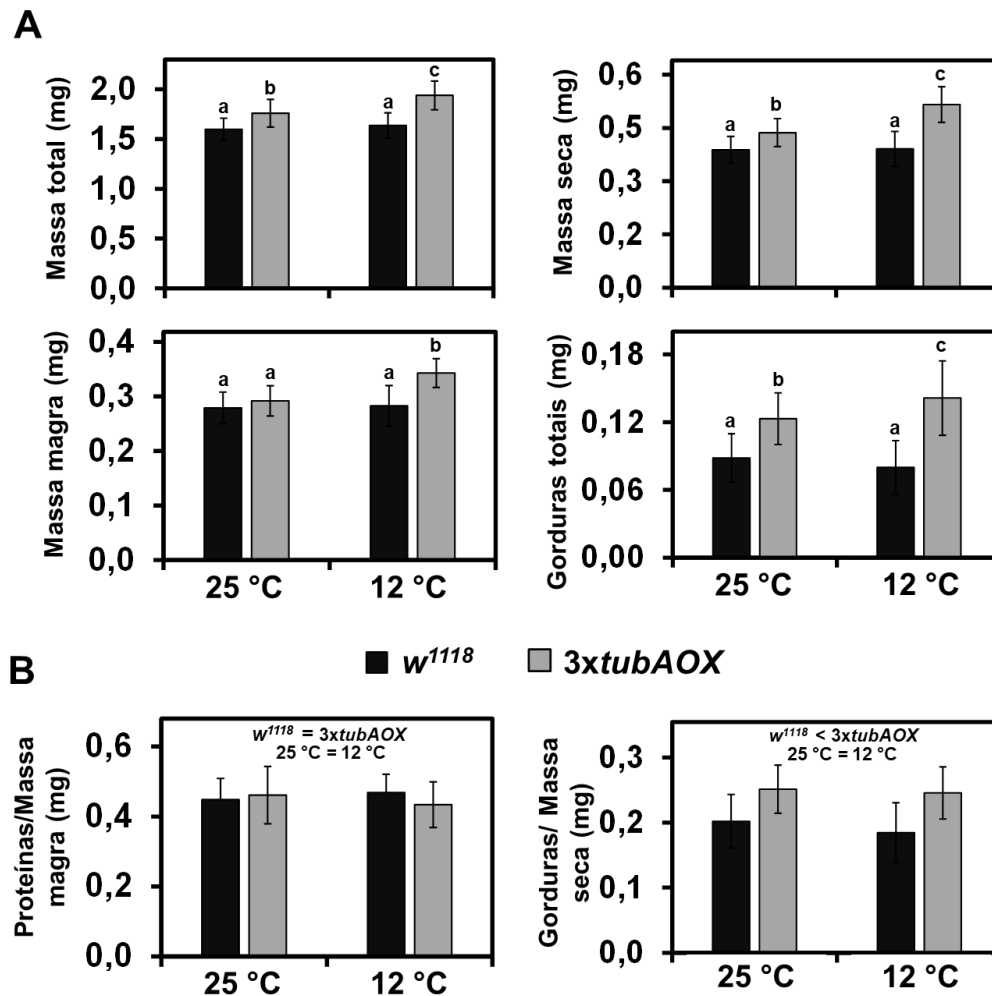
## 5.2 AOX contribui para o acúmulo de biomassa e crescimento larval

Uma vez que as larvas mantêm a temperatura corpórea mais elevada e são mais ágeis, buscamos entender como essa enzima impacta o seu crescimento e acúmulo de biomassa. Dado que o funcionamento de AOX levaria a uma ineficiência na conversão energética, com dissipação na forma de calor, era esperado que larvas AOX tivessem um menor acúmulo de biomassa, com um possível déficit de algum macronutriente específico. Contrariamente, a expressão de AOX contribuiu para um aumento significativo de biomassa larval, o qual foi acentuado sob estresse térmico. A 25 °C, os aumentos foram de ~10 – 12 % na massa total e seca (Figura 7A). Já a 12 °C, a massa total das larvas AOX foi ~19 % mais elevada do que a das larvas controles, com a massa seca ~33 % maior, ao passo que as larvas controles não apresentaram nenhum aumento nesses valores por causa da baixa temperatura (Figura 7A).

Uma análise mais detalhada mostrou claramente que o aumento de biomassa em larvas AOX foi causado por uma quantidade mais elevada de gordura corpórea, ~40 e 60 %, respectivamente a 25 e 12 °C (Figura 7A). Isso representa um aumento de ~20 % na massa de gordura relativa (proporção gorduras/massa seca), independente da temperatura (Figura 7B). Notamos também que a massa magra não se diferencia entre as linhagens a 25 °C, mas que a 12 °C ela é elevada em ~20 % nas larvas AOX. Entretanto, não identificamos diferenças estatisticamente significativas na razão proteínas/massa magra em nenhuma das condições testadas. O aumento na massa de larvas AOX também foi associado a um aumento do comprimento e da largura do corpo larval, independentemente da temperatura (Figura 8A e B).

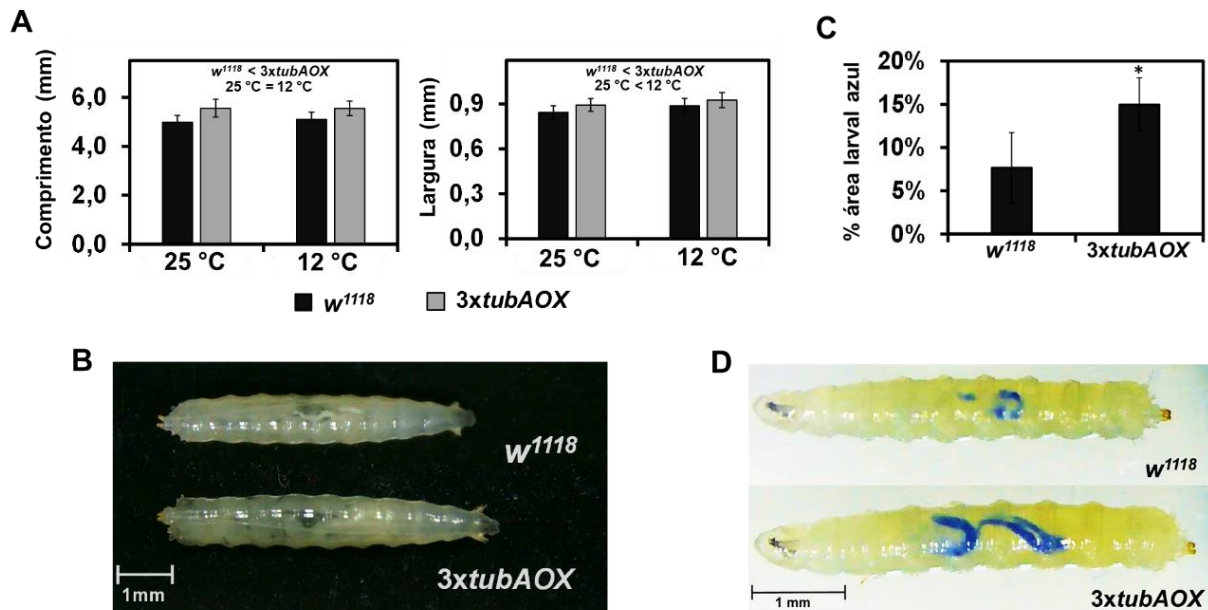
Antes de entendermos quais alterações bioquímico-metabólicas favoreceriam o aumento de biomassa e o crescimento larval, nós avaliamos se a presença da AOX estaria estimulando também a ingestão alimentar. Após um período de 3h em jejum, as larvas foram deixadas por 5 min em uma dieta corada de azul, permitindo averiguar a área correspondente à comida ingerida em seu intestino. Nossos resultados mostraram que as larvas AOX ingerem aproximadamente o dobro de comida durante esse período de tempo (Figura 8C).

Figura 7 - Avaliação da biomassa de larvas L3 errantes desenvolvidas a 25 e a 12 °C



(A) A massa total, seca e magra foi obtida assim como descrito nos Materiais e Métodos. O valor de gorduras totais foi calculado através da subtração “massa seca – massa magra”. Os valores representam a média individual +/- o desvio padrão de 3 repetições biológicas compostas por pelo menos 24 grupos de 10 larvas cada. As letras “a-c” indicam classes estatísticas diferentes, de acordo com *two-way* ANOVA seguida pelo teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ). (B) A massa relativa de proteína e gorduras foi calculada através da razão “massa de proteínas/massa magra” e “massa de gorduras totais/massa seca”.  $w^{1118} < 3xtubAOX$  indica diferenças significativas entre as linhagens (controle e AOX); “25 °C < 12°C” indica diferença significativa entre as temperaturas, de acordo com *two-way* ANOVA ( $p < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 - Tamanho de larvas desenvolvidas a 25 e a 12 °C e estimativa da ingestão alimentar



(A) A quantificação do comprimento e da largura de L3 errantes foi realizada assim como descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média de 3 repetições biológicas, com pelo menos 24 medições individuais cada. “*w<sup>1118</sup> < 3xtubAOX*” indica diferenças significativas entre as linhagens (controle e AOX); “25 °C < 12 °C” indica diferença significativa entre as temperaturas, de acordo com *two-way* ANOVA, ( $p < 0,001$ ). (B) Imagem representativa de microscopia de luz mostrando duas L3 do mesmo sexo (fêmeas) cultivadas a 12°C. (C) Quantificação de ingesta calculada a partir da porcentagem de área correspondente ao intestino larval corada em relação a área total das larvas L3 de 84-90h (detalhes no Materiais e Métodos). (D) Imagem representativa de microscopia de luz mostrando L3 após ingestão de dieta corada. Valores representam a média +/- o desvio padrão de 13-19 indivíduos amostrados em 2 repetições biológicas. \* indica diferença significativa entre as médias dos grupos ( $p < 0,05$  de acordo com o teste t de *Student*). Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 A expressão de AOX reconfigura o ETS mitocondrial de larvas

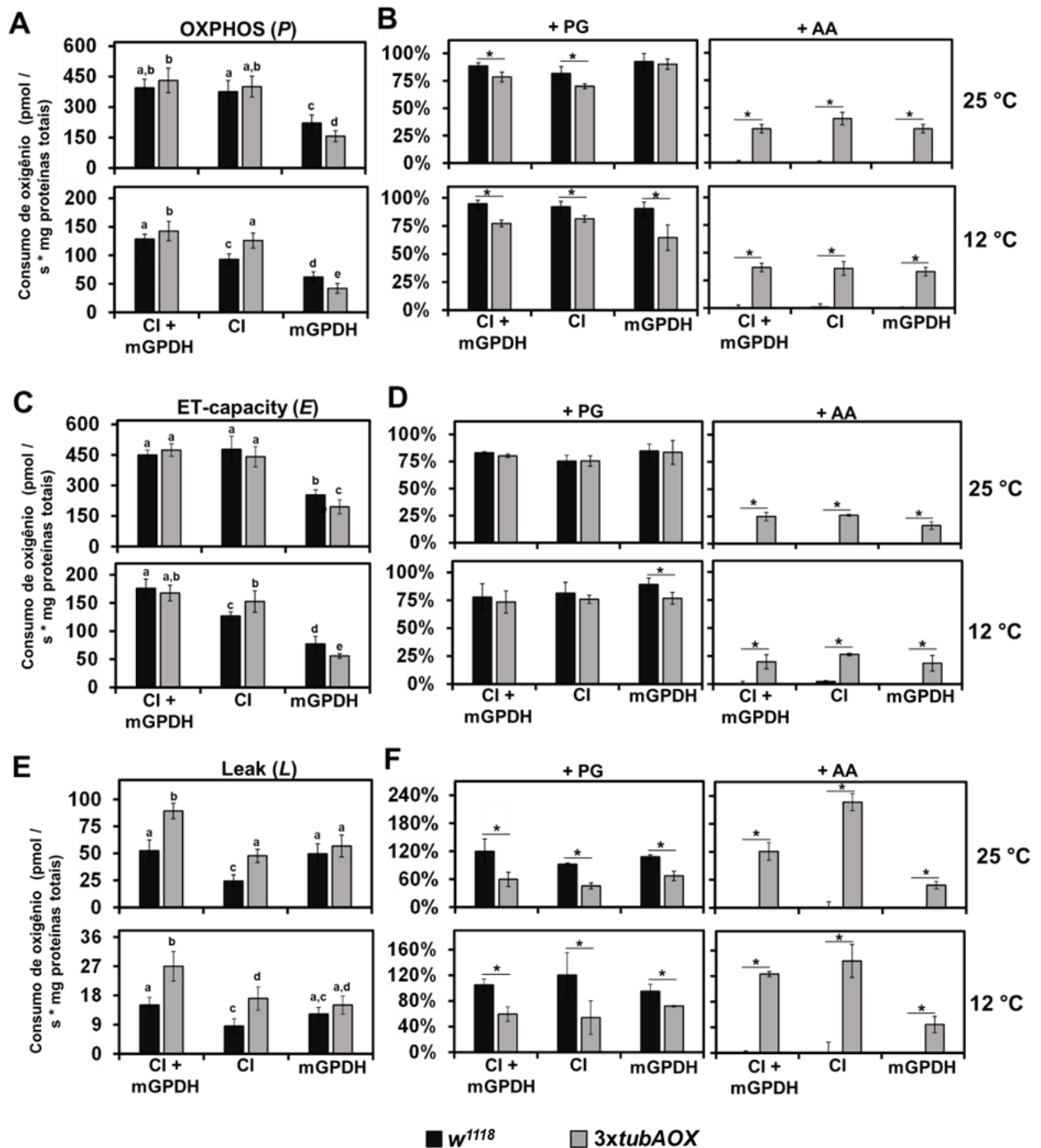
Para compreensão dos efeitos fenotípicos aparentemente contrastantes de aumento concomitante de temperatura corpórea e de acúmulo de biomassa das larvas AOX, analisamos o consumo de oxigênio mitocondrial de extratos larvais mantido por diferentes vias do ETS e calculamos as razões de controle respiratório. Testes preliminares indicaram que CI e mGPDH (muito provavelmente a isoforma 1, codificada pelo gene *Gpo1*) são duas das principais desidrogenases da MIM do conjunto de mitocôndrias larvais, sendo responsáveis por uma porcentagem significativamente alta da atividade do ETS que culmina em redução do O<sub>2</sub> (dados não

apresentados). Verificamos então como cada via iniciada por estas duas desidrogenases, individualmente e em combinação, responde à presença de AOX em diferentes estados mitocondriais.

A 25 °C, ao fornecermos substratos a CI + mGPDH concomitantemente, observamos que a taxa de consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado OXPHOS, *P*) não se diferencia substancialmente entre larvas AOX e controle (Figura 9A). Observamos ainda que CI sozinho é capaz de sustentar a respiração com valores semelhantes aos de CI + mGPDH, indicando que mGPDH exerce pouca aditividade à respiração nessa condição térmica. O valor de respiração iniciada exclusivamente via mGPDH é ~56 % do valor máximo obtido com CI + mGPDH em larvas controles. Interessantemente, a respiração via mGPDH em larvas AOX chega a apenas ~40 % da respiração máxima gerada por CI + mGPDH, o que é ~30 % menor do que em larvas controles. A 12 °C (Figura 9A), é notável que o consumo de oxigênio mantido por CI + mGPDH é elevado em ~10 % na presença de AOX. Interessantemente, a respiração via CI em larvas AOX é ~35 % mais elevada do que nos controles, alcançando valores tão altos quanto os da respiração mantida por CI + mGPDH nas larvas controles. Além disso, observamos que a respiração mantida exclusivamente por mGPDH a 12 °C segue um padrão semelhante ao de 25 °C, com uma diminuição de ~30 % em larvas AOX. Essa alteração no estado *P* de mitocôndrias de larvas AOX, com aumento da respiração iniciada por CI e diminuição da via mGPDH, indica uma reconfiguração importante do ETS mitocondrial induzida por AOX.

O próximo passo foi averiguar a participação ativa de AOX no estado *P*, através de sua inibição com propilgalato (+PG) (Figura 9B). Observamos que, a 25 °C, a respiração mantida por CI + mGPDH ou apenas por CI em larvas AOX é significativamente mais sensível ao inibidor propilgalato, enquanto a respiração via mGPDH não foi afetada. A 12 °C, a participação de AOX para o consumo de oxigênio no estado *P* iniciado via CI ou mGPDH, independente ou concomitantemente, em larvas AOX ficou bem clara, já que as quedas nos valores após adição de propilgalato foram sempre significativas. Também verificamos, paralelamente, a respiração no estado *P* resistente à antimicina A, inibidor do CIII (+AA) (Figura 9B). Essa medida evidencia o máximo de respiração que a AOX é capaz de manter na ausência de CIII. Enquanto antimicina A abole toda a respiração mitocondrial da linhagem controle, em larvas AOX, 30-40 % da respiração é mantida tanto a 25 quanto a 12 °C, independentemente se ela ocorre via CI e/ou mGPDH.

Figura 9 - Taxas de consumo de oxigênio mitocondrial larval na presença de AOX a 25 °C e a 12 °C mantidas pelas desidrogenases indicadas



A respiração em extratos de L3 errantes via complexo I (CI) foi iniciada depois da adição de piruvato e malato; glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mGPDH) foi ativada pela adição de glicerol-3-fosfato. (A) Respiração no estado fosforilativo (OXPHOS, *P*) medida após adição de ADP. (C) Respiração no estado de capacidade máxima de transferência de elétrons (ET-capacity, *E*) medida após titulação de CCCP. (E) Respiração no estado de Leak, *L*, gerado após adição oligomicina (inibidor da ATP sintase) em experimentos distintos. As letras “a-e” representam classes estatísticas diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com teste *a posteriori* de Tukey precedido por uma *two-way* ANOVA. (B), (D) e (F)

As porcentagens da taxa de consumo de oxigênio mantidas respectivamente em *P*, *E* e *L* após inibição da AOX com propilgalato (+PG) ou inibição do complexo III com antimicina A (+AA). \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de larvas controle e AOX (*w<sup>1118</sup>* e *3xtubAOX*) de acordo com testes t de *Student* para cada condição de vias testada. Os dados representam médias +/- desvio padrão de pelo menos 3 repetições biológicas. Fonte: Elaborado pela autora.

Avaliamos posteriormente o estado de consumo de oxigênio que representa a capacidade máxima do ETS de mitocôndrias larvais (ET-capacity, estado *E*), alcançada pela titulação do protonóforo CCCP após o fornecimento de substratos de CI e/ou mGPDH e adição de ADP. Essa medida é importante para saber se o sistema de fosforilação (ATP sintase) limita a capacidade do ETS: quanto maior o aumento da respiração nesse estado em relação ao estado *P*, maior é esta limitação. Além disso, por ser um estado respiratório com baixo  $\Delta\Psi_m$  por causa do desacoplamento total do transporte de elétrons da síntese de ATP, é esperado que AOX participe menos significativamente nestas condições. Interessantemente, as alterações detectadas para o estado *P* na presença de AOX parecem ser refletidas no estado *E*, mas em menor proporção: observamos diminuição da respiração via mGPDH nas duas temperaturas e aumento via CI a 12 °C (Figura 9C). É possível notar que, sob baixa temperatura, a respiração no geral aumenta em maior proporção no estado *E* em relação ao *P*, mas esse efeito é menos intenso na presença de AOX (Figuras 9C e A).

A adição de antimicina A (+AA) também aboliu a respiração do estado *E* por completo nas larvas controles, como esperado (Figura 9D). A respiração de larvas AOX nesta condição, independentemente da temperatura, foi de 20 a 28 % menor do que no estado *P*, o que se reflete em uma porcentagem do estado *E* total bem menor do que aquela que AOX proporciona quando o estado *P* é inibido com antimicina A, indicando a importância do  $\Delta\Psi_m$  para a atividade de AOX. Por outro lado, a adição de propilgalato (+PG) de um modo geral não alterou o consumo de oxigênio em nenhuma das condições testadas, exceto a 12 °C, quando a via da mGPDH foi alimentada (Figura 9D). Esses resultados indicam que AOX contribui para o transporte de elétrons via mGPDH, mesmo com baixo  $\Delta\Psi_m$  em temperaturas baixas, e que a reconfiguração do ETS causada por AOX é complexa, podendo ocorrer indiretamente pela alteração da abundância de CI e mGPDH ou por regulação alostérica de suas atividades enzimáticas.

#### 5.4 AOX eleva a respiração Leak das mitocôndrias larvais

O terceiro estado mitocondrial avaliado foi o chamado de Leak (estado *L*), uma condição com elevado  $\Delta\Psi_m$  e não acoplada, ou seja, sem produção de ATP, onde o consumo de oxigênio ocorre apenas devido ao vazamento de prótons através da MIM e não pela ATP sintase. Em ambas as temperaturas testadas, observamos que a respiração no estado *L* via CI + mGPDH ou apenas via mGPDH não se diferencia na linhagem controle, e que via CI apenas a respiração é significativamente mais baixa (Figura 9E), indicando que o máximo da capacidade de *L* desse sistema é alcançado apenas com mGPDH. Entretanto, em larvas AOX, observamos que esta enzima alternativa dobra o consumo de oxigênio no estado *L* via CI + mGPDH ou apenas via CI, mas via mGPDH, a respiração se mantém semelhante às larvas controles. Com a inibição de AOX com propilgalato (+PG), a porcentagem de respiração via CI + mGPDH ou via CI decresce pela metade (Figura 9F), confirmando a ação direta de AOX nos aumentos do estado *L* descritos acima. Via mGPDH, a respiração decresce em 35 % com a inibição de AOX, indicando que a enzima também contribui para uma maior capacidade de Leak por meio dessa desidrogenase.

Por fim, calculamos qual a porcentagem máxima da respiração no estado *L* que a AOX mantém, inibindo CIII com antimicina A (+AA). Mais uma vez, como esperado e observado em todos os estados respiratórios avaliados neste trabalho, esse inibidor aboliu totalmente a respiração na linhagem controle, independentemente da temperatura e via alimentada (Figura 9F). Entretanto, em larvas AOX, um padrão peculiar foi encontrado: a AOX sustentou um consumo de oxigênio bem mais elevado via CI + mGPDH ou apenas via CI nesta condição do que quando CIII estava ativo. A 25 °C, a respiração chegou a aumentar ~2.4 X após a inibição do CIII. Em outras palavras, a ausência da atividade de CIII/IV permitiu à AOX manter uma respiração no estado *L* via CI expressivamente maior do que aquela mantida por AOX e CIII/IV juntos. Já para a respiração via mGPDH, esse efeito não foi observado; AOX manteve o equivalente a ~50 % do consumo de oxigênio total mantido por AOX + CIII/CIV. Esse resultado sugere que na presença de CIII/CIV funcionais, AOX não tem acesso a todas as moléculas de CoQH<sub>2</sub> reduzidas por CI.

#### 5.5 A eficiência da OXPHOS é significativamente diminuída na presença de AOX, principalmente via mGPDH

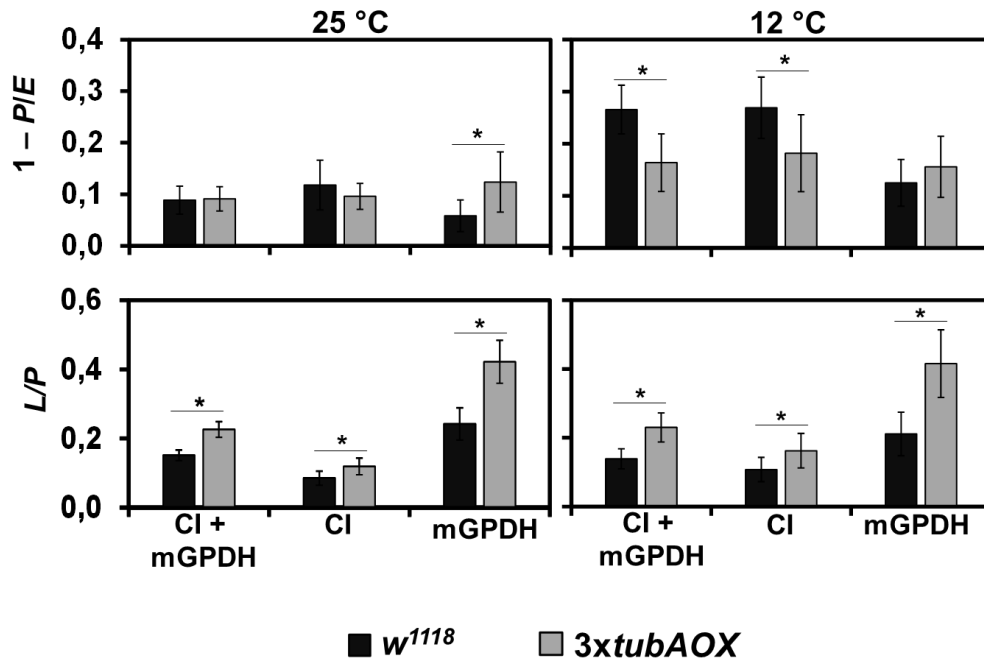
Para entendermos melhor de que forma AOX está interferindo com o ETS e com a OXPHOS e causando as alterações fisiológicas e comportamentais descritas acima, calculamos duas taxas relacionadas ao controle respiratório mitocondrial. Primeiro analisamos a eficiência de controle  $E-P$  (do inglês, *E-P control efficiency*) calculada através da fórmula  $1-P/E$ , para averiguarmos se o sistema de fosforilação está exercendo algum controle sobre o ETS para desempenhar a OXPHOS. De um modo geral, à medida que a respiração no estado  $E$  aumenta muito em relação a obtida no estado  $P$ , é evidenciado um elevado controle do sistema de fosforilação sobre o ETS. Observamos que a 25 °C, as razões foram baixas quando avaliadas para CI + mGPDH e para apenas CI, em ambas as linhagens de larvas (Figura 10), indicando que, nessas condições, há uma baixa limitação (~10 %) para o ETS desempenhar a OXPHOS, e que isso não é significativamente alterado pela AOX. Já para a respiração mantida exclusivamente por mGPDH, embora esta se mostre ainda menos limitada pela ATP sintase em larvas controles, a presença de AOX impõe uma maior limitação pelo sistema de fosforilação no transporte de elétrons.

Quando analisamos essas taxas a 12 °C, observamos que a limitação do ETS aumenta pelo menos 2X para todas as vias, mas tal aumento é menor na presença de AOX. A única exceção é para mGPDH, cuja limitação pelo sistema de fosforilação em larvas AOX não se diferenciou da linhagem controle a 12 °C, mantendo-se próxima do valor a 25 °C. Em conjunto, esses valores indicam que, apesar do fluxo de elétrons através da via mGPDH-AOX ser mais limitado pela ATP sintase a 25 °C, AOX induz um fluxo menos limitado pelo sistema de fosforilação via CI a 12 °C, o que é consistente com um aumento do fluxo metabólico e o acúmulo expressivo de biomassa que larvas AOX atingem nesta temperatura (Figura 7).

Calculamos também a razão de controle do acoplamento da respiração à síntese de ATP (do inglês, *coupling-control ratio*), obtido através do cálculo  $L/P$ , que é crucial para responder sobre a termogênese causada por AOX, questão norteadora do nosso trabalho. Quanto maior esta razão, maior é a ineficiência do processo de OXPHOS, e conseqüentemente, de forma geral, maior é a dissipação da energia da transferência de elétrons em forma de calor. AOX diminui a eficiência de OXPHOS em todas as vias testadas, independentemente da temperatura. Notavelmente, mGPDH, cuja via de transporte de elétrons já é naturalmente menos acoplada do que aquela iniciada por CI, é mais afetada por AOX, com valores de ineficiência da OXPHOS aproximadamente dobrados na presença dessa enzima alternativa em ambas as

temperaturas testadas (Figura 10). Isso acarreta maior dissipação de energia, o que é consistente com o calor corpóreo mais elevado de larvas AOX (Figura 5).

Figura 10 - Taxas de controle respiratório mitocondrial são alteradas pela AOX



Os gráficos superiores representam a taxa de limitação da respiração mitocondrial imposta ao ETS pelo sistema de fosforilação. Essa taxa foi calculada como “1 – (valor de taxa respiratória no estado  $P$  / valor no estado  $E$ )” para a respiração mantida pelas desidrogenases em extratos de L3 errantes às temperaturas indicadas. Os gráficos inferiores representam taxas de controle de acoplamento da OXPHOS, em que se averigua a proporção da respiração ineficiente à produção de ATP, através da razão “valor de taxa respiratória no estado  $L$  (obtido sem adição de adenilato) / valor no estado  $P$ ”. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 4 repetições biológicas. “\*” indica diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) de acordo com testes t de *Student*. Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.6 AOX altera significativamente os níveis de metabólitos intermediários em larvas

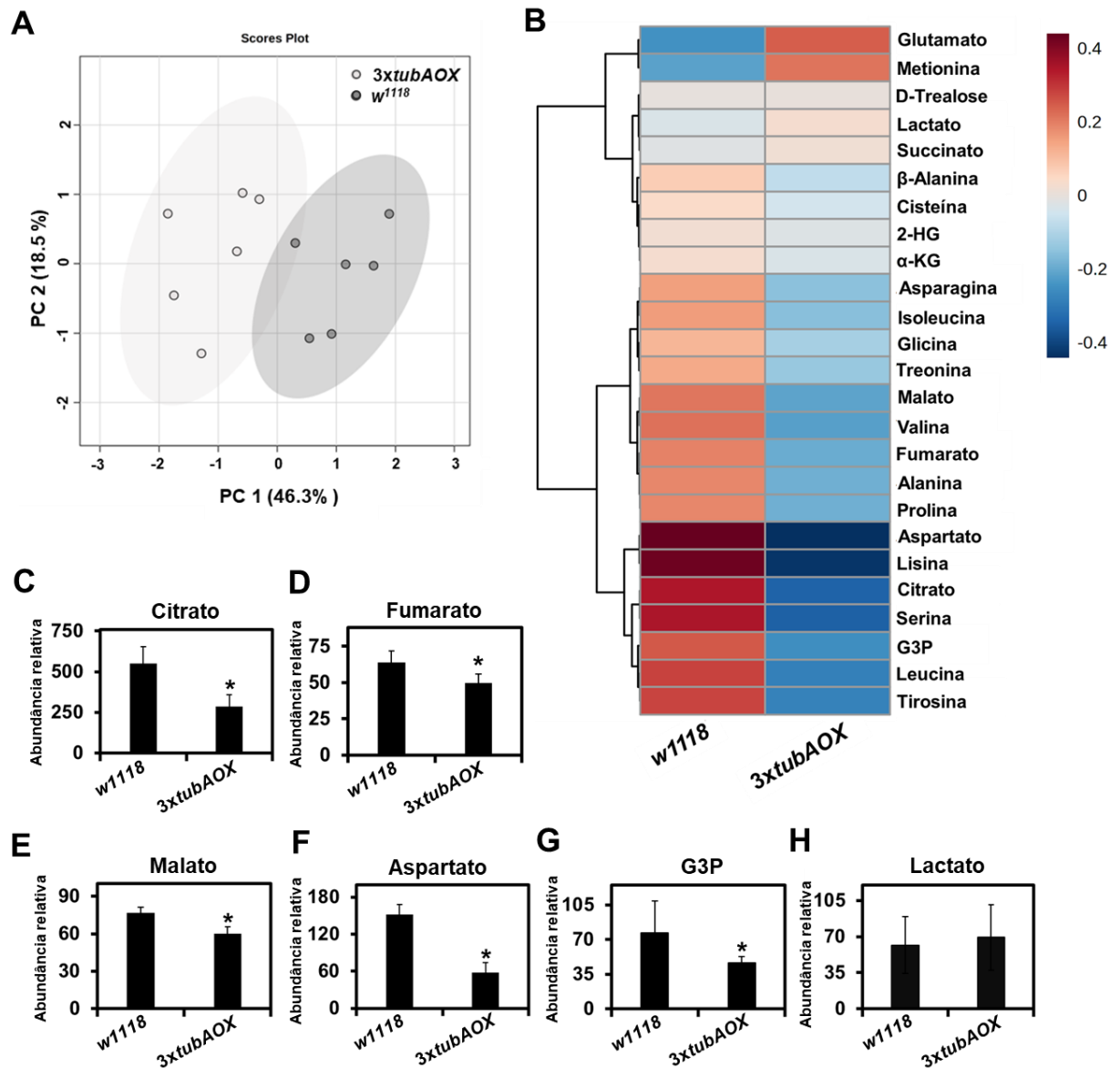
A partir dos resultados obtidos na análise da fisiologia mitocondrial indicando uma reconfiguração no ETS de mitocôndrias larvais, buscamos avaliar como isso afeta o metabolismo intermediário das larvas, independentemente de estresse frio, isto é, apenas em organismos desenvolvidos a 25 °C. Levamos em consideração a configuração metabólica larval e quantificamos por meio de GC-MS a abundância de G3P (substrato da mGPDH), intermediários do TCA, lactato, 2-HG e alguns aminoácidos em L3 errantes, principal estágio larval avaliado em todo o trabalho.

Submetemos o conjunto de dados à PCA (detalhes em Materiais e Métodos) e identificamos que as amostras obtidas de *w<sup>1118</sup>* se separam das amostras de *3xtubAOX*, evidenciando que a AOX altera o perfil metabólico das larvas significativamente (Figura 11A). Essa alteração é provocada pela diminuição substancial dos níveis da maioria dos metabólitos identificados (Figura 11B), como intermediários do TCA, com destaque ao citrato, cuja abundância relativa caiu pela metade (Figura 11C). Fumarato e malato também tiveram níveis decrescidos, mas em menor proporção (~23 %) (Figuras 11D e E, respectivamente). Dentre os aminoácidos, enquanto glutamato e metionina são mais abundantes na presença da AOX (Figura 11B), a maioria dos aminoácidos também foram encontrados em níveis decrescidos, mas aspartato se destacou devido à queda de ~60 % (Figura 11F). Quanto ao G3P, as larvas apresentaram diminuição de ~40 % na sua abundância (Figura 11G), mas não tiveram alterações significativas quanto aos níveis de lactato (Figura 11F) e de 2-HG (Figura 11B).

Por fim, averiguamos se as principais alterações encontradas também apresentavam padrões semelhantes no estágio de L2 médio, no qual a larva está ainda em período de crescimento intenso. Para essa análise nós quantificamos apenas intermediários do TCA, níveis de G3P, lactato e 2-HG e investigamos além da linhagem *3xtubAOX*, duas linhagens com níveis relativamente baixos de AOX (*tubAOX<sup>35</sup>* e *tubAOX<sup>7</sup>*) para entender se os efeitos seriam dose dependente.

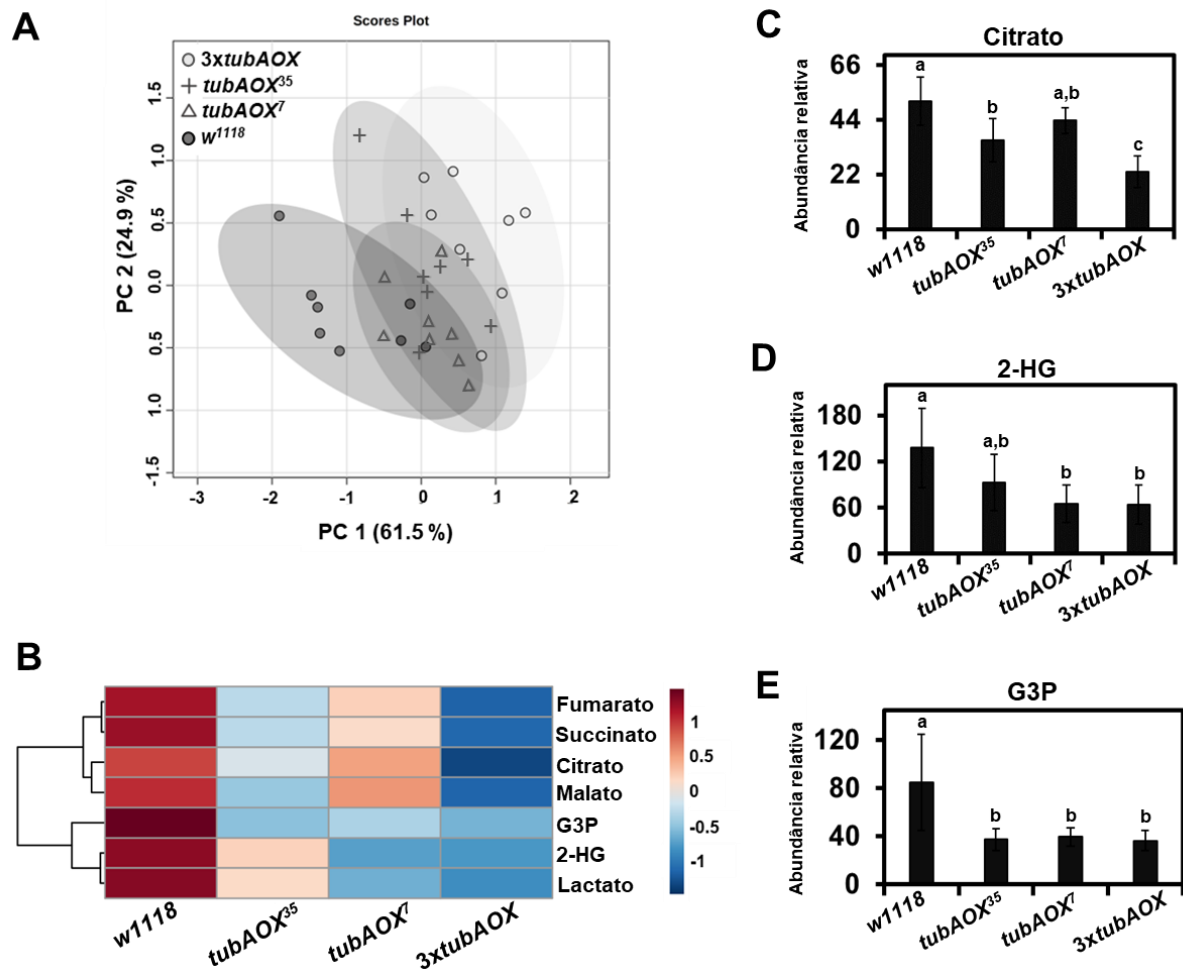
Embora o conjunto de dados fosse menor para a análise com L2, a PCA indicou separação entre as amostras de *3xtubAOX* e *w<sup>1118</sup>*, enquanto as de *tubAOX<sup>35</sup>* e *tubAOX<sup>7</sup>* não se separaram claramente, mesclando os perfis metabólicos tanto com o controle quanto com a *3xtubAOX* (Figura 12A). Notadamente, todos os metabólitos quantificados são diminuídos na presença da AOX, e isso é mais intenso em *3xtubAOX*, indicando um efeito dose-dependente, para a maioria dos metabólitos (Figura 12B). Dentre os intermediários do TCA, o citrato é o metabólito que mais se destaca, chegando a ser 50 % menos abundante na linhagem com o maior nível de AOX (Figura 12C). Interessantemente, no estágio de L2 foi observado também um decréscimo de até 50 % nos níveis de 2-HG (Figura 12D). Foi evidente, por fim, que as linhagens AOX não se diferenciam entre si quanto aos níveis de G3P, mas todas se diferenciam de *w<sup>1118</sup>* por apresentarem 55 % menor abundância desse metabólito.

Figura 11 - Análise metabolômica em L3 errantes cultivadas a 25 °C mostra diferenças causadas pela AOX



Os dados foram obtidos a partir do método direcionado de metabolômica baseado em GC-MS para comparação entre *w<sup>1118</sup>* e *3xtubAOX* da abundância relativa de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), glicerol-3-fosfato (G3P), lactato, 2-hidroxioglutarato (2-HG) e aminoácidos. (A) Gráfico de PCA mostrando separação entre os grupos quanto aos seus perfis metabólicos. (B) Heat maps mostrando diminuição nos níveis de intermediários do TCA, G3P e alguns aminoácidos na presença da AOX. (C-H) Abundância relativa dos metabólitos indicados representada pela média medias +/- desvio padrão. \* indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ) de acordo com Testes T de *Student*. A e B foram conduzidas usando o MetaboAnalyst 5.0 (detalhes em Materiais e Métodos). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12 - Análise metabolômica em L2 cultivadas a 25 °C apontando diferenças causadas pela AOX em diferentes níveis.



Os dados foram obtidos a partir de método direcionado de metabolômica baseado em GC–MS para comparação entre a linhagem controle *w<sup>1118</sup>*, linhagens com baixos níveis de AOX (*tubAOX<sup>35</sup>* e *tubaOX<sup>7</sup>*) e com nível relativamente alto (*3xtubAOX*) quanto a abundância relativa de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), glicerol-3-fosfato (G3P), lactato, 2-hidroxioglutarato (2-HG). (A) Gráfico de PCA mostra separação entre os grupos quanto aos seus perfis metabolômicos. (B) Heat maps mostrando diminuição dose dependente dos metabólidos causada pela AOX. (C-E) Abundância relativa dos metabólitos indicados representada pela média medias +/- desvio padrão. Letras a-c indicam classes estatísticas diferentes apontadas ( $p < 0,05$ ) de de acordo com teste *a posteriori* de Tukey precedido por uma *one-way* ANOVA. A e B foram conduzidas usando o MetaboAnalyst 5.0 (descrição detalhada em Materiais e Métodos). Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

Ao se estudar o efeito da variação térmica sobre insetos, especificamente *D. melanogaster*, sabe-se que, no geral, a diminuição da temperatura ambiental causa

diminuição da mobilidade (MCPARLAND; FOLLANSBEE; GANTER, 2015) e aumento do tamanho e da massa larval durante o desenvolvimento desses organismos (CHEN et al., 2014; GHOSH; TESTA; SHINGLETON, 2013). Algumas das consequências previstas da termogênese causada pela expressão transgênica de AOX, conforme apontaram as nossas análises de termografia, seriam maior agilidade larval em baixas temperaturas e diminuição da massa corpórea, teoricamente devido à ineficiência da transformação energética por desacoplamento mitocondrial. De acordo com esta hipótese, revelamos neste trabalho que as larvas que expressam AOX possuem atividade locomotora significativamente mais elevada do que a linhagem controle, principalmente quando cultivadas a 12 °C. Esses resultados complementam trabalhos anteriores, nos quais mostramos que a expressão de AOX acelera significativamente o desenvolvimento e aumenta a viabilidade larval nessa mesma temperatura estressante (SAARI et al., 2019b).

Nossos estudos de fisiologia mitocondrial sugerem que o aumento na temperatura corpórea detectado em larvas AOX é resultante de um aumento significativo da ineficiência da OXPHOS larval, principalmente via mGPDH. Isso se deve, de acordo com nossos resultados, a uma interação funcional entre mGPDH e AOX que é fútil para a produção de ATP, já que ambas as enzimas não contribuem para o  $\Delta\Psi_m$ . Essa configuração do ETS larval, portanto, constitui um mecanismo termogênico, semelhante àquele observado em plantas como a “repolho gambá”, *Symplocarpus renifolius* (ONDA et al., 2008) e a flor de lótus, *N. nucifera* (WATLING; ROBINSON; SEYMOUR, 2006), em que uma desidrogenase e uma oxidase terminal não bombeadora de prótons são usadas para desacoplamento mitocondrial e termogênese. A configuração mGPDH-AOX em larvas AOX é funcionalmente importante a 12 °C, pois ela mantém uma respiração no estado *L* via mGPDH em valores comparados com àqueles em larvas controles, apesar da queda na respiração suportada por mGPDH induzida pela presença da própria AOX, detectada neste trabalho. Além disso, nesta temperatura, AOX é capaz de sustentar aproximadamente um terço da respiração no estado *P* via mGPDH, o que foi observado pela combinação entre os dados gerados na presença de propilgalato (que levam a uma queda de ~30% no consumo de oxigênio com a AOX inibida) e na presença de antimicina A (que levam a uma queda de ~65% da respiração com CIII/CIV inibidos). Neste último caso, o segmento CIII/CIV parece não conseguir sustentar o consumo de oxigênio total via mGPDH, diferentemente do que ocorre a 25 °C. Interessantemente, evidências

indicam que mGPDH é menos sensível ao frio do que outras desidrogenases da MIM (MASSON et al., 2017), sendo usada, por exemplo, pela mamangaba-de-cauda-amarela, *Bombus terrestris*, em um mecanismo termogênico de pré-aquecimento dos músculos do voo quando a temperatura ambiente atinge níveis próximos ao ponto de congelamento (MASSON et al., 2017).

Por outro lado, apesar da ineficiência de OXPHOS, constatamos um aumento significativo na biomassa e no crescimento larval na presença de AOX, em ambas as temperaturas, sendo mais pronunciado sob estresse térmico frio. Este resultado contraria nossa hipótese inicial de que a via de termogênese mitocondrial da AOX, sem conservação de energia para síntese de ATP, opor-se-ia ao metabolismo anabólico larval, conseqüentemente comprometendo o crescimento. Juntamente aos dados mostrando aumento da ingestão alimentar pelas larvas AOX, a reconfiguração do ETS larval que descrevemos neste trabalho também fornece uma explicação para que a presença de AOX favoreça o crescimento e acúmulo de biomassa. O aumento da respiração via CI nos estados *P* e *E* na presença de AOX e a diminuição da limitação imposta pelo sistema de fosforilação a 12 °C indicam maior fluxo de elétrons via CI e conseqüentemente, maior reoxidação de NADH. Esse fenômeno pode ser atribuído a um aumento do fluxo metabólico através do ciclo do TCA, que demandaria uma maior oxidação de acetil-CoA para gerar mais NADH e suprir a demanda elevada de substratos para CI nessas condições. Dado que as reações de cataplerose do TCA são cruciais para o crescimento larval (JACOBS; GEORGE; KEMPPAINEN, 2020; OWEN; KALHAN; HANSON, 2002), levantamos a hipótese de um aumento da atividade do TCA, o que favoreceria a utilização dos seus intermediários para as vias biossintéticas. Esse efeito se assemelharia a adaptações metabólicas observadas em larvas de *D. melanogaster* mutantes para o gene *DmDG* (ortólogo do gene de distroglicana de mamíferos), que apresentam maior tolerância ao frio: tais organismos apresentam aumento do metabolismo mitocondrial oxidativo. Ao mesmo tempo, essas larvas elevam a produção de CO<sub>2</sub>, e possuem atividade dobrada da enzima piruvato desidrogenase, que pode ser limitante ao TCA, pois converte piruvato em acetil-CoA (TAKEUCHI et al., 2009).

Os níveis decrescidos de intermediários do TCA mostrados nas nossas análises metabolômicas dão suporte à ideia de que eles estejam sendo consumidos rapidamente e/ou de que a cataplerose esteja aumentada na presença de AOX. Especialmente o citrato, cujos níveis decaíram pela metade em larvas AOX, é formado

pela fusão de oxaloacetato e acetil-CoA (primeira reação do TCA), ou através da carboxilação de  $\alpha$ -KG, e pode ser transportado para o citosol, onde a enzima citrato liase o cliva em oxaloacetato e acetil-CoA. Este último é utilizado na síntese de ácidos graxos e, posteriormente, lipídeos (ICARD et al., 2021). Assim, o citrato é considerado um precursor lipídico, e especialmente em células cancerígenas, que apresentam metabolismo muito comparável ao das larvas de *D. melanogaster*, no qual os nutrientes são convertidos eficientemente em biomassa, esse metabólito exerce um papel central devido à cataplerose (DEBERARDINIS et al., 2008; ICARD et al., 2021). A rápida renovação das moléculas de oxaloacetato e acetil-CoA fazem com que os níveis de citrato sejam encontrados sempre baixos, e a administração de altas doses de citrato têm apresentado, inclusive, efeitos anticancerígenos (ICARD et al., 2021). As moléculas de oxaloacetato no citosol podem ser utilizadas para a síntese de nucleotídeos, mas também podem ser convertidas em malato para adentrarem a matriz mitocondrial, onde são convertidas em oxaloacetato novamente, reiniciando o ciclo do TCA (GUO et al., 2023; ICARD et al., 2021). A entrada de malato na mitocôndria pode ocorrer através de um sistema de lançadeira denominado citrato-malato, que é composto por transportadores antiportadores presentes na MIM que exportam citrato e importam malato (GUO et al., 2023). Assim, baixos níveis de citrato e malato, em conjunto com os nossos dados que mostraram aumento de massa relativa de gordura, reforçam a ideia de que a AOX favorece o programa metabólico proliferativo. A relação da baixa concentração de aspartato e o aumento nos níveis de glutamato dentro desse panorama deverão ser mais bem estudados, mas isso pode indicar uma alteração no funcionamento da lançadeira malato-aspartato, que é outra forma do malato retornar à matriz mitocondrial às custas da saída de aspartato (BORST, 2020).

A conexão entre o metabolismo tumoral e o larval ficou ainda mais clara desde que foi mostrado que as larvas de *D. melanogaster* produzem naturalmente elevadas concentrações de 2-HG, um oncometabólito em células de mamíferos (LI et al., 2017; MAHMOUDZADEH et al., 2020). No entanto, nós mostramos neste trabalho que, embora as larvas AOX cresçam mais, a abundância de 2-HG não é alterada em L3 errantes e, em L2, seus níveis são, na verdade, diminuídos significativamente. Sabemos que a reação que leva à formação de 2-HG a partir de  $\alpha$ -KG é reversível e acoplada à reoxidação de NADH (DU; HU, 2021; LI et al., 2017). Tendo isso em vista, nós conjecturamos que o aumento da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  via CI em larvas AOX

contribua para a estabilidade ou até mesmo diminuição dos níveis 2-HG, mesmo sem o estímulo do estresse térmico frio. De fato, a diminuição na atividade do ETS mitocondrial, com a diminuição de reoxidação de NADH, é correlacionada com o acúmulo de 2-HG (LI; HURLBURT; TENNESSEN, 2018). Além disso, quando comparamos os dois estágios larvais analisados quanto ao perfil metabólico, entendemos que L2 está ainda crescendo intensamente e se alimentando no interior do meio, uma condição que pode causar hipóxia, enquanto L3 errantes estão em fase final de crescimento e já deixaram o meio. Interessantemente, já foi reportado também que a hipóxia é um elemento chave para aumento dos níveis de 2-HG em insetos (MAHMOUDZADEH et al., 2020). Assim, é plausível considerar que a AOX contribua para diminuição dos efeitos da hipóxia, diminuindo a produção desse oncometabólito.

O programa metabólico proliferativo é caracterizado pela utilização da glicólise para a produção de grandes quantidades de ATP, mesmo em condições aeróbicas, daí o nome glicólise aeróbica (DRUMMOND-BARBOSA; TENNESSEN, 2020; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG, 1956)(DRUMMOND-BARBOSA; TENNESSEN, 2020). Mesmo assim, a respiração mitocondrial é fundamental para a manutenção do TCA, como temos discutido, sustentando um crescimento rápido. A relevância da OXPHOS torna-se mais evidente quando o seu bloqueio com inibidores da ATP-sintase, ou o truncamento do fluxo de elétrons com inibidores do CIII ou CI, levam ao cessamento da proliferação de células tumorais (BIANCHI et al., 2018; GALBER et al., 2020; TAN et al., 2019; WANG; MA; QIAN, 2021). Entretanto, já se mostrou em osteosarcomas que o bloqueio proliferativo causado pela inibição de ATP sintase é revertido pela adição de desacopladores, como o FCCP (GALBER et al., 2020; SULLIVAN et al., 2015). Isso mostra que o papel da OXPHOS na produção de ATP não é o mais relevante para a proliferação celular, mas sim o fluxo de elétrons e consequentemente a reoxidação de NADH ou outros metabólitos reduzidos, já que a maioria do ATP é produzida via glicólise aeróbica (GALBER et al., 2020). Dessa maneira, entendemos que o ETS possa suportar o crescimento mesmo estando desacoplado, porém ressaltamos que sob efeito sistêmico de um tumor real, ou no caso da larva de *D. melanogaster* o sistema OXPHOS completo pode ser necessário. Testes futuros poderão ser feitos *in-vivo*, para avaliar o crescimento larval na presença de AOX, combinando-se a adição de oligomicina e antimicina A na dieta, já que vimos que quando ATP-sintase e CIII estão inibidos, AOX mantém um consumo relativamente alto de oxigênio, totalmente

desacoplado da síntese de ATP. Testes com linhagens que apresentem defeitos na ATP-sintase e expressem AOX também podem gerar resultados importantes para expandir a interpretação dos efeitos encontrados até então.

O sistema de fosforilação mitocondrial é composto principalmente pela ATP-sintase, mas também pela translocase de nucleotídeos de adenina (ANT) e o carreador de fosfato (GNAIGER, 2020). Averiguamos se este é limitante à respiração OXPHOS, uma vez que medimos a taxa respiratória no estado de capacidade máxima do ETS, sustentado por CI e/ou mGPDH. Notamos que a baixa temperatura aumenta a limitação da OXPHOS pelo sistema de fosforilação, uma característica já reportada na literatura (SCOTT et al., 2019). Entretanto, essa limitação é bem menor na presença da AOX, e supomos que este seja mais um resultado relacionado ao efeito termogênico. Por outro lado, a expressão de ATP-sintase pode estar aumentada para compensar o desacoplamento, e isso deve ser avaliado futuramente, em conjunto com uma avaliação da morfologia mitocondrial.

Como mGPDH é a enzima através da qual a respiração mitocondrial é diminuída na presença de AOX com ineficiência da OXPHOS, possivelmente a interação desacopladora mGPDH-AOX seja uma condição chave aos ajustes do ETS provocados por AOX, contribuindo para os fenótipos aqui apresentados. Nesse sentido, medimos os níveis de G3P, substrato da mGPDH, produto da cGPDH, e um dos componentes principais componentes do metabolismo intermediário, que conecta a glicólise, a OXPHOS e o metabolismo de lipídeos, através de um sistema de lançadeira (MRÁČEK; DRAHOTA; HOUŠTĚK, 2013). Nós, inicialmente, pressupomos que a diminuição da respiração no estado OXPHOS via mGPDH na presença de AOX levaria ao acúmulo desse metabólito, e esse efeito estaria também relacionado ao aumento da massa relativa de gordura, considerando o que já foi reportado para leveduras. Por exemplo, em algumas oleaginosas, o acúmulo de gordura é aumentado por superexpressão do gene codificador da isoforma 1 da cGPDH, o que eleva os níveis de G3P. Além disso, quando se combinam defeitos na lançadeira de G3P a uma via de beta-oxidação deficiente, ocorre aumento de ácidos graxos livres e triacilgliceróis, gerando linhagens que acumulam até 75 % de massa seca composta por lipídeos (DULERMO; NICAUD, 2011). No entanto, nossos dados para larvas L3 errantes e L2, apontaram que a AOX, mesmo expressa em baixos níveis, diminui a abundância de G3P. Uma vez que este metabólito também é um precursor de triglicerídeos, há a possibilidade de ele estar sendo utilizado em excesso para a

biossíntese dessas macromoléculas, se tornando, portanto, limitante. Todavia, nossos dados enfatizam a necessidade de melhor entendimento da regulação da interação funcional mGPDH-AOX.

Um outro ponto importante a ser discutido, consiste nos efeitos que a temperatura exerce sobre as reservas energéticas, o que também se relaciona com a massa das moscas. Sabe-se que, embora altas temperaturas contribuam para diminuição de reservas energéticas (como a gordura) e baixas temperaturas contribuam para o efeito inverso (aumento das reservas), a exposição a temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 27 °C não obedece a tal correlação inversa, pois o estresse térmico (alto ou baixo) causa diminuição das reservas em moscas (KLEPSATEL; WILDRIDGE; GÁLIKOVÁ, 2019). Isso nos permite especular que os impactos da AOX sobre aumento de peso a 25 e a 12 °C, observados em nosso trabalho, podem ser resultantes de uma combinação de efeitos, como o estímulo do metabolismo oxidativo com consequência no crescimento/acúmulo de biomassa no contexto larval, mas também devido a termogênese diminuir os efeitos do frio a 12 °C, permitindo que a taxa de crescimento seja mais acelerada numa condição estressante (SAARI et al., 2018).

Quando analisamos os resultados encontrados para a respiração via CI, consideramos que o aumento da taxa respiratória no estado *P*, que demanda mais reoxidação de NADH e foi mais significativo a 12 °C, pode ser resultante de um mecanismo para compensar o ATP não produzido pela respiração ineficiente via mGPDH. Não podemos deixar de destacar que a respiração no estado *L* via CI também foi 2X maior em larvas AOX, impactando a taxa de controle de acoplamento, com diminuição da eficiência da OXPHOS por essa via também, porém em proporções menores do que via mGPDH. O vazamento de prótons através da MIM, além de diminuir o acoplamento mitocondrial, é um mecanismo que tende a evitar a formação de ROS e manter a homeostase celular (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; KOWALTOWSKI et al., 2009; NICHOLLS, 2021). Nossos dados indicam que a AOX atua no ETS larval majoritariamente através do Leak, modulando os diferentes estados mitocondriais e impactando possivelmente os níveis de ROS. Dependendo do tipo celular e dos mecanismos regulatórios, o aumento da respiração no estado *L* pode gerar efeitos distintos, apesar da produção de calor ser a consequência mais discutida, podendo ser até mesmo a causa de patologias (DIVAKARUNI; BRAND, 2011; GRIFFITHS et al., 2020). Podemos, portanto, especular que condições

patológicas que causem limitações ao funcionamento da ATP sintase, ou até mesmo doenças mitocondriais que comprometam concomitantemente outros componentes do ETS, tais como doenças relacionadas a depleções do DNA mitocondrial, possam ser resgatadas ou agravadas pela AOX. Se a demanda de ATP por OXPHOS for alta, a AOX pode prejudicar bastante e agravar a deficiência energética. Por outro lado, em tecidos onde a necessidade da manutenção do fluxo de elétrons é mais importante que a produção de ATP, a AOX pode ser chave para restaurar o fluxo metabólico.

Ainda em relação a respiração no estado *L* sustentado por CI, observamos também que a inibição do CIII estimula o consumo de oxigênio via AOX para níveis altíssimos, ~ 2,4X maiores do que a respiração mantida por CIII/CIV e AOX juntos. O valor de respiração praticamente se iguala aos valores da respiração resistente à antimicina A no estado *P* (quando a ATP sintase não está inibida). Isso claramente não acontece quando a respiração no estado *L* é sustentada por mGPDH. Sabemos que no estado *L* o  $\Delta\Psi_m$  é elevado, já que a ATP sintase não está funcionando e há um acúmulo de prótons no espaço inter-membranas. Em sistemas artificiais, foi mostrado que elevado  $\Delta\Psi_m$  aumenta a condutância de prótons através de UCPs na presença de ácidos graxos, o que aumenta o consumo de oxigênio desacoplado (RUPPRECHT et al., 2010). Além disso, o aumento do  $\Delta\Psi_m$  também está correlacionado com a produção de ROS pelo CIII (ROTTENBERG; COVIAN; TRUMPOWER, 2009). Uma vez que AOX torna-se parte constituinte do ETS, alto  $\Delta\Psi_m$  e muita produção de ROS devem proporcionar aumento da atividade da AOX. Isso nos indica a necessidade de medir o  $\Delta\Psi_m$  e os níveis de ROS nas condições estudadas neste trabalho.

Contudo, por que em larvas AOX o aumento expressivo da respiração no estado *L* via CI só ocorre após inibição do CIII? Quando comparamos as vias, encontramos além da diferença dos substratos que elas utilizam, os quais endogenamente são provenientes de processos metabólicos distintos, uma diferença estrutural: CI pode interagir fisicamente com CIII e CIV, formando os chamados supercomplexos respiratórios (LAPUENTE-BRUN et al., 2013; MILENKOVIC et al., 2017), que podem aprisionar moléculas de CoQ/CoQH<sub>2</sub> em uma configuração que permite o fluxo de elétrons contínuo entre as mesmas moléculas de CI e CIII. O aumento expressivo no estado *L*, portanto sugere que a inibição do CIII com antimicina permite à AOX “acessar” um novo *pool* de CoQH<sub>2</sub> (reduzida por CI) que era exclusivo do CIII. Ainda precisamos avaliar se o uso de antimicina A rompe supercomplexos ou se

simplesmente permite que moléculas de CoQ presas nessas estruturas possam se dissipar livremente pela MIM.

A configuração do sistema de supercomplexos é dinâmica, podendo ser modificada de acordo com a disponibilidade de nutrientes, isto é, correspondentemente ao tipo do substrato predominante. Com isso, há variação na proporção de NADH e FADH<sub>2</sub> e na taxa CoQH<sub>2</sub>/CoQ, com conseqüente reconfiguração dos supercomplexos respiratórios para uma maior eficiência do ETS (GUARÁS et al., 2016; SPEIJER, 2011). Nós então especulamos que desidrogenases do ETS mitocondrial que não formam supercomplexos e são associadas a FAD (como mGPDH) interagem com AOX com maior facilidade, desacoplando a mitocôndria. Interações como essas, com diminuição da eficiência energética e com efeito termogênico, levam à reconfiguração do ETS, favorecendo o crescimento larval, e impactando significativamente o metabolismo larval. Estudos investigando as configurações estruturais dos complexos e supercomplexos do ETS na presença de AOX são também necessários para entendermos os aspectos bioquímicos descritos neste trabalho. Tais estudos podem ainda iluminar o entendimento de aspectos evolutivos do ETS mitocondrial, incluindo aqueles relacionados à AOX.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos que AOX aumenta a capacidade de respiração no estado Leak via CI, e leva a uma significativa diminuição da eficiência energética da OXPHOS via mGPDH, mas esses efeitos são parcialmente compensados via estímulo da OXPHOS sustentada por CI. AOX possui então efeito termogênico em metazoários, funcionalmente importante em condições de frio, capaz de aumentar a atividade locomotora, a temperatura corpórea, o acúmulo de biomassa e o crescimento larval. Considerando a importância terapêutica da enzima, e que o metabolismo larval (glicolítico aeróbico) é comparável ao de tecidos proliferativos, alertamos a necessidade de cautela a aplicação terapêutica dessa enzima, pois a reconfiguração gerada no ETS, em decorrência do desacoplamento e da interação preferencial com mGPDH, pode estimular a cataplerose e o crescimento tecidual, em concordância com a alteração do perfil metabólico intermediário das larvas, uma característica extremamente não desejável no contexto de tumores. Finalmente, reafirmamos a AOX como uma ferramenta essencial ao aprimoramento do entendimento sobre o controle respiratório mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

- AKRAM, M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475–478, 26 set. 2014.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- ANDJEIKOVIĆ, 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**, v. 6, n. 9, p. 2839–2846, 2016.
- 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**, 2015.
- AON, M. A.; CORTASSA, S.; O'ROURKE, B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2010.
- BAINBRIDGE, S. P.; BOWNES, M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. **Development**, v. 66, n. 1, p. 57–80, 1 dez. 1981.
- BANERJEE, R.; PURHONEN, J.; KALLIJÄRVI, J. The mitochondrial coenzyme Q junction and complex III: biochemistry and pathophysiology. **The FEBS Journal**, 2021.
- BENNETT, J. M. et al. The evolution of critical thermal limits of life on Earth. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 19 fev. 2021.
- BIANCHI, G. et al. Curcumin induces a fatal energetic impairment in tumor cells in vitro and in vivo by inhibiting ATP-synthase activity. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 9, p. 1141–1150, 21 set. 2018.
- BIANCO, A. C. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 281–289, ago. 2000.
- BORECKÝ, J.; VERCESI, A. E. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein and Alternative Oxidase: Energy Metabolism and Stress. **Bioscience Reports**, v. 25, n. 3–4, p. 271–286, 8 jun. 2005.
- BORST, P. The malate–aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway. **IUBMB Life**, v. 72, n. 11, p. 2241–2259, 1 nov. 2020.
- BOUKALOVA, S. et al. Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**,

v. 1866, n. 6, p. 165759, 1 jun. 2020.

BOURENS, M. et al. Redox and Reactive Oxygen Species Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 16, p. 1940, 12 dez. 2013.

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**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRANDT, A.; VILCINSKAS, A. The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model for Aging Research. In: VILCINSKAS, A. (Ed.). **Yellow Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. v. 135p. 63–77.

BRESSON, J.-L. et al. Dietary Reference Values for choline. **EFSA Journal**, v. 14, n. 8, p. e04484, 1 ago. 2016.

BRISCHIGLIARO, M. et al. Structural rather than catalytic role for mitochondrial respiratory chain supercomplexes. **eLife**, v. 12, p. 1–23, 2023.

BRZEZINSKI, P.; MOE, A.; ADELROTH, P. Structure and Mechanism of Respiratory III–IV Supercomplexes in Bioenergetic Membranes. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 15, p. 9644, 8 ago. 2021.

CAMPANELLA, M. et al. IF 1 : setting the pace of the F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 7, p. 343–350, 2009.

CAMPOS-ORTEGA, J. A.; HARTENSTEIN, V. Stages of *Drosophila* Embryogenesis. In: **The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster***. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 1985. p. 9–84.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. 2004.

CARMON, A. et al. The  $\alpha$  Glycerophosphate Cycle in *Drosophila melanogaster* V. Molecular Analysis of a Glycerophosphate Dehydrogenase and a Glycerophosphate Oxidase Mutants. **Journal of Heredity**, v. 2010, n. 2, p. 218–224, 2009.

CHEN, R. H.; CHEN, Y. H.; HUANG, T. Y. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. **Journal of Biomedical Science** **2019 26:1**, v. 26, n. 1, p. 1–12, 21 out. 2019.

CHEN, S. Y. et al. The effects of temperature on the time to maturation of *Drosophila melanogaster*. **The Expedition**, v. 3, p. 1–10, 2014.

CHENG, J. et al. Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of

- Cardiovascular Diseases. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 982, p. 359, 1 maio 2017.
- CHENNA, S. et al. Mechanisms and mathematical modeling of ROS production by the mitochondrial electron transport chain. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 323, n. 1, p. C69–C83, 1 jul. 2022.
- CHOKCHAIWONG, S. et al. ETF-QO mutants uncoupled fatty acid  $\beta$ -oxidation and mitochondrial bioenergetics leading to lipid pathology. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 1–19, 2019.
- 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**, 2005.
- CHRÉTIEN, D. et al. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. **PLOS Biology**, v. 16, n. 1, p. e2003992, 1 jan. 2018.
- CORMIER, R. P. J. et al. Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 14 mar. 2019.
- DANIEL, R. M. et al. **The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications** *Extremophiles*, 2008.
- 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, 2009.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 9 jan. 2008.
- DILLON, M. E. et al. Review: Thermal preference in *Drosophila*. **Journal of thermal biology**, v. 34, n. 3, p. 109, 4 abr. 2009.
- DIVAKARUNI, A. S.; BRAND, M. D. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 26, n. 3, p. 192–205, 2011.
- DOGAN, S. A. et al. Perturbed Redox Signaling Exacerbates a Mitochondrial Myopathy. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 764–775, 2018.
- DOLEŽELOVÁ, E. et al. Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of *Trypanosoma brucei*. **PLOS Biology**, v. 18, n. 6, p. e3000741, 1 jun. 2020.
- DRUMMOND-BARBOSA, D.; TENNESSEN, J. M. Reclaiming Warburg: Using developmental biology to gain insight into human metabolic diseases. **Development**

- (Cambridge), v. 147, n. 11, 14 jun. 2020.
- DU, X.; HU, H. The Roles of 2-Hydroxyglutarate. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 651317, 26 mar. 2021.
- DU, Z. et al. Structure of the human respiratory complex II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 118, p. e2216713120, 2 maio 2023.
- DULERMO, T.; NICAUD, J. M. Involvement of the G3P shuttle and  $\beta$ -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 5, p. 482–491, 1 set. 2011.
- DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International Wound Journal**, 2017.
- EFEYAN, A.; COMB, W. C.; SABATINI, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 302–310, 15 jan. 2015.
- 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. Expression of the alternative oxidase mitigates beta-amyloid production and toxicity in model systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 96, p. 57–66, 2016.
- FALKENBERG, M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 287, 7 jul. 2018.
- FARKAS, T. Adaptation of fatty acid composition to temperature—a study on carp (*Cyprinus carpio* L.) liver slices. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 79, n. 4, p. 531–535, 1 jan. 1984.
- FARMER, C. G. A lizard that generates heat. **Nature** 2016 **529:7587**, v. 529, n. 7587, p. 470–472, 27 jan. 2016.
- FERNANDEZ-AYALA, D. J. M. et al. Expression of the *Ciona intestinalis* Alternative Oxidase (AOX) in *Drosophila* Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 449–460, 2009.
- 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, 2007.
- FIEDORCZUK, K.; SAZANOV, L. A. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure

and Disease-Causing Mutations. **Trends in cell biology**, v. 28, n. 10, p. 835–867, 1 out. 2018.

**Flying Through History: Nobel Prizes for Fruit Fly Research (Part 1) – Future Fields**. Disponível em: <<https://futurefields.io/blogs/flylab/nobel-flies-part-1>>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa**. 63. ed. Rio de Janeiro/São Paulo: Paz e Terra, 2020.

FREYA, T. G.; MANSELLAB, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 7, p. 319–324, 1 jul. 2000.

GALBER, C. et al. The role of mitochondrial ATP synthase in cancer. **Biological Chemistry**, v. 401, n. 11, p. 1199–1214, 1 out. 2020.

GARCIA, G. S. et al. An Affordable and Efficient “Homemade” Platform for Drosophila Behavioral Studies, and an Accompanying Protocol for Larval Mitochondrial Respirometry. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 2021, n. 175, p. e62669, 24 set. 2021.

GHEZZI, D.; ZEVIANI, M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 271, 7 jul. 2018.

GHOSH, S. M.; TESTA, N. D.; SHINGLETON, A. W. Temperature-size rule is mediated by thermal plasticity of critical size in *Drosophila melanogaster*.

**Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1760, 2013.

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

GNAIGER, E. **Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis**. 5. ed. Innsbruck, Austria: Bionergetics Communications, 2020. v. 2

GOTO, S. G. et al. Fatty acids of membrane phospholipids in *Drosophila melanogaster* lines showing rapid and slow recovery from chill coma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010.

GRIFFITHS, K. K. et al. Inefficient thermogenic mitochondrial respiration due to futile proton leak in a mouse model of fragile X syndrome. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 6, p. 7404–7426, 1 jun. 2020.

GUARÁS, A. et al. The CoQH2/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain

- Efficiency. **Cell Reports**, v. 15, n. 1, p. 197–209, 5 abr. 2016.
- GUDERLEY, H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 409–427, 1 maio 2004.
- GUERRERO-CASTILLO, S. et al. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 128–139, 10 jan. 2017.
- GUO, D. et al. Determiners of cell fates: the tricarboxylic acid cycle versus the citrate-malate shuttle. **Protein & Cell**, v. 14, n. 3, p. 162–164, 13 abr. 2023.
- 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**, v. 61, n. 2, p. 598, 1968.
- HADRAVA VANOVA, K. et al. Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. **Redox Report : Communications in Free Radical Research**, v. 25, n. 1, p. 26, 1 jan. 2020.
- 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, 2006.
- HALES, K. G.; FULLER, M. T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 121–129, 11 jul. 1997.
- HARTMANN, T. et al. Thermopile chip based calorimeter for the study of aggregated biological samples in segmented flow. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 201, p. 460–468, 1 out. 2014.
- HAZEL, J. R. Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000315>, v. 57, p. 19–42, 28 nov. 1995.
- HEINRICH, B. Beating the Heat in Obligate Insect Endotherms: The Environmental Problem and the Organismal Solutions. **Integrative and Comparative Biology**, v. 29, n. 3, p. 1157–1168, 1 ago. 1989.
- HEINRICH, B. Insect thermoregulation. **Endeavour**, v. 19, n. 1, p. 28–33, 1 jan. 1995.
- HERST, P. M. et al. Functional mitochondria in health and disease. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 296, 2017.
- HILL, R. W. .; WYSE, G. A. .; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2ª ed. Porto

Alegre: Artmed, 2012.

HOEFNAGEL, M. H. N.; WISKICH, J. T. Activation of the Plant Alternative Oxidase by High Reduction Levels of the Q-Pool and Pyruvate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 355, n. 2, p. 262–270, 15 jul. 1998.

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**, 2015.

ICARD, P. et al. Understanding the Central Role of Citrate in the Metabolism of Cancer Cells and Tumors: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2 jun. 2021.

INABA, Y. I. et al. Alternative oxidase capacity of mitochondria in microsporophylls may function in cycad thermogenesis. **Plant Physiology**, v. 180, n. 2, p. 743–756, 1 jun. 2019.

INIGO, M.; DEJA, S.; BURGESS, S. C. Ins and Outs of the TCA Cycle: The Central Role of Anaplerosis. **Annual Review of Nutrition**, v. 41, p. 19–47, 2021.

IWATA, S. et al. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5373, p. 64–71, 3 jul. 1998.

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, 1 out. 2023.

JACOBS, H. T.; GEORGE, J.; KEMPPAINEN, E. Regulation of growth in *Drosophila melanogaster*: The roles of mitochondrial metabolism. **Journal of Biochemistry**, 2020.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 53, 2010.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 407–440, fev. 2009.

JONCKHEERE, A. I.; SMEITINK, J. A. M.; RODENBURG, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 2, p. 211, mar. 2012.

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

- KAUN, K. R. et al. Natural variation in food acquisition mediated via a *Drosophila* cGMP-dependent protein kinase. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 20, p. 3547–3558, 15 out. 2007.
- KEMPPAINEN, K. K. et al. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 8, p. 2078–2093, 2014.
- 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**, 2014.
- KHAMINETS, A.; BEHL, C.; DIKIC, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 6–16, 1 jan. 2016.
- KLEPSATEL, P. et al. Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 19 set. 2016.
- KLEPSATEL, P.; WILDRIDGE, D.; GÁLIKOVÁ, M. Temperature induces changes in *Drosophila* energy stores. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- KNUTSON, R. M. Heat Production and Temperature Regulation in Eastern Skunk Cabbage. **Science**, v. 186, n. 10, p. 746–747, 1974.
- KOHSIMA, S. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. **Nature** **1984 310:5974**, v. 310, n. 5974, p. 225–227, 1984.
- KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–343, 15 ago. 2009.
- KU, C. et al. Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. **Nature**, v. 524, n. 7566, p. 427–432, 2015a.
- KU, C. et al. Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: Inherited chimerism in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 33, p. 10139–10146, 2015b.
- LANGE, C.; HUNTE, C. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2800–2805, 5 mar. 2002.
- LAPUENTE-BRUN, E. et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. **Science**, v. 340, n. 6140, p. 1567–1570, 2013.
- LAROSA, V.; REMACLE, C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. **Bioscience Reports**, v. 38, p. BSR20171492, 2018.

- LI, H. et al. Drosophila larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 6, p. 1353–1358, 7 fev. 2017.
- LI, H. et al. Lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase cooperatively regulate growth and carbohydrate metabolism during Drosophila melanogaster larval development. **Development (Cambridge, England)**, v. 146, n. 17, 2019.
- LI, H.; HURLBURT, A. J.; TENNESSEN, J. M. A Drosophila model of combined D-2- and L-2-hydroxyglutaric aciduria reveals a mechanism linking mitochondrial citrate export with oncometabolite accumulation. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 9, 1 set. 2018.
- LI, H.; TENNESSEN, J. M. Preparation of Drosophila Larval Samples for Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-based Metabolomics. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 2018, n. 136, p. 57847, 6 jun. 2018.
- LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 6, p. 361–370, 1 jun. 2005.
- LIU, X. et al. Mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase promotes skeletal muscle regeneration. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2018.
- LIU, Y. J. et al. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 186, p. 111212, 1 mar. 2020.
- LOVERO, D. et al. Characterization of Drosophila ATPsynC mutants as a new model of mitochondrial ATP synthase disorders. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2018.
- LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 175–190, 1 mar. 2011.
- MACHEREL, D. et al. The conundrum of hot mitochondria. **BBA-Bioenergetics**, v. 1862, p. 148348, 2021.
- MAHMOUDZADEH, N. H. et al. The oncometabolite L-2-hydroxyglutarate is a common product of dipteran larval development. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 127, p. 103493, 1 dez. 2020.
- MASSON, S. W. C. et al. Mitochondrial glycerol 3-phosphate facilitates bumblebee

- pre-flight thermogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2017.
- MATTHIAS, A. et al. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25073–25081, 18 ago. 2000.
- MATUS-ORTEGA, M. G. et al. The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**, v. 6, n. 3, p. 256–263, 2011.
- MCDONALD, A. E. et al. Evolution of AOX genes across kingdoms and the challenge of classification. In: GUPTA, K. J.; MUR, L. A. J.; NEELWARNE, B. (Eds.). . **Alternative Respiratory Pathways in Higher Plants**. [s.l.] Wiley Online Library, 2015. p. 267–272.
- MCDONALD, A. E.; GOSPODARYOV, D. V. **Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: Proposed physiological roles in animals** **Mitochondrion** Elsevier B.V., , 1 mar. 2019.
- MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C. Branched mitochondrial electron transport in the animalia: Presence of alternative oxidase in several animal phyla. **IUBMB Life**, 2004a.
- MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C. Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso Sea. **Gene**, v. 349, p. 15–24, 2005.
- MCDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C.; STAPLES, J. F. Alternative oxidase in animals: Unique characteristics and taxonomic distribution. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 2627–2634, 2009.
- MCDONALD, A.; VANLERBERGHE, G. Branched Mitochondrial Electron Transport in the Animalia: Presence of Alternative Oxidase in Several Animal Phyla. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 56, n. 6, p. 333–341, 1 jun. 2004b.
- MCPARLAND, A. L.; FOLLANSBEE, T. L.; GANTER, G. K. Measurement of larval activity in the Drosophila activity monitor. **Journal of Visualized Experiments**, 2015.
- MEEUSE, B. J. D. Thermogenic Respiration in Aroids. **Annual Review of Plant Physiology**, 1975.
- MILENKOVIC, D. et al. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 765–776, abr. 2017.

- MISHRA, P.; CHAN, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. **The Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 4, p. 379, 2 fev. 2016.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 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 Biology**, 2013.
- MOULIN, C.; CAUMONT-SARCOS, A.; IEVA, R. Mitochondrial presequence import: Multiple regulatory knobs fine-tune mitochondrial biogenesis and homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 5, p. 930–944, 1 maio 2019.
- MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MRÁČEK, T.; DRAHOTA, Z.; HOUŠTĚK, J. **The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues****Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2013.
- MULLER, F.; CROFTS, A. R.; KRAMER, D. M. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Qo site of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. **Biochemistry**, v. 41, n. 25, p. 7866–7874, 25 jun. 2002.
- MURPHY, M. P.; HARTLEY, R. C. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 865–886, 2018.
- NEDERGAARD, J. et al. UCP1: The only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 82–106, 1 mar. 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Ciclo do ácido cítrico. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 633–667.
- NICHOLLS, D. G. Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1862, n. 7, p. 148428, 1 jul. 2021.
- NICHOLS, C. D.; BECNEL, J.; PANDEY, U. B. Methods to assay Drosophila behavior. **Journal of visualized experiments : JoVE**, v. 61, n. e3795, 2012.
- 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. 636, 2008.
- ONG, C. et al. Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–406, 2015.

ORR, A. L. et al. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42921–42935, 14 dez. 2012.

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, 2002.

PALADE, G. E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 1, n. 4, 1953.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388, 7 jul. 2021.

PERILLO, B. et al. Nuclear receptor-induced transcription is driven by spatially and timely restricted waves of ROS: The role of Akt, IKK $\alpha$ , And DNA damage repair enzymes. **Nucleus**, 2014.

PIMENTEL, E. R. Mitocôndria. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A. CÉLULA (Ed.). . **A célula**. 3. ed. Barueri: Manole, 2013. p. 369–385.

POÇAS, G. M.; DOMINGOS, P. M.; MIRTH, C. K. Quantification of macronutrients intake in a thermogenetic neuronal screen using drosophila larvae. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 160, p. 1–20, 1 jun. 2020.

POPOV, L. D. Mitochondrial biogenesis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 4892, 1 maio 2020.

PORTER, C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue. **Adipocyte**, v. 6, n. 2, p. 167, 3 abr. 2017.

QUINLAN, C. L. et al. The determination and analysis of site-specific rates of mitochondrial reactive oxygen species production. **Methods in Enzymology**, v. 526, p. 189–217, 2013a.

QUINLAN, C. L. et al. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 304–312, 2013b.

QUINN, P. J. **Effects of temperature on cell membranes. Symposia of the Society for Experimental Biology**, 1988.

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

RAMBOLD, A. S. et al. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. v. 108, n. 25, 2011.

- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Eckert - Fisiologia Animal Mecanismos e Adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- RASMUSSEN, A. G.; FERNIE, A. R.; VAN DONGEN, J. T. **Alternative oxidase: A defence against metabolic fluctuations? Physiologia Plantarum**, dez. 2009.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558416>>. Acesso em: 4 maio. 2020
- RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. **Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling Cellular Signalling**, 2012.
- REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. **Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research Elsevier B.V.**, , 1 dez. 2016.
- 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. 10882, p. 1–10, 2018.
- ROGER, A. J.; MUÑOZ-GÓMEZ, S. A.; KAMIKAWA, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1177–R1192, 6 nov. 2017.
- ROGOV, A. G. et al. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n. 13, p. 1615–1634, 2014.
- ROTTENBERG, H.; COVIAN, R.; TRUMPOWER, B. L. Membrane potential greatly enhances superoxide generation by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex reconstituted into phospholipid vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19203–19210, 17 jul. 2009.
- ROY CHOWDHURY, S. K. et al. Increased expression of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and antioxidant enzymes in prostate cancer cell lines/cancer. **Free Radical Research**, v. 41, n. 10, p. 1116–1124, out. 2007.
- RUPPRECHT, A. et al. Role of the transmembrane potential in the membrane proton leak. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 8, p. 1503–1511, 21 abr. 2010.
- SAARI, S. et al. Expression of *Ciona intestinalis* AOX causes male reproductive defects in *Drosophila melanogaster*. **BMC Developmental Biology**, v. 17, n. 9, p. PMC5496232, 2017.
- SAARI, S. et al. Alternative respiratory chain enzymes: Therapeutic potential and possible pitfalls. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, out.

2018.

SAARI, S. et al. Alternative oxidase confers nutritional limitation on *Drosophila* development. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, 2019a.

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, 2019b.

SALVI, F.; GADDA, G. Human choline dehydrogenase: Medical promises and biochemical challenges. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 537, n. 2, p. 243, 2013.

SÁNCHEZ-CENIZO, L. et al. Up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a warburg phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25308–25313, 2010.

SCHAGGER, H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. **The EMBO Journal**, 2000.

SCHEFFLER, I. E. Metabolic Pathways Inside Mitochondria. In: SCHEFFLER, I. E. (Ed.). **Mitochondria**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 1999. p. 246–272.

SCOTT, K. Y. et al. Adjustments in the control of mitochondrial respiratory capacity to tolerate temperature fluctuations. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 18, 15 set. 2019.

SEEBACHER, F. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: What is the role of phenotypic flexibility? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 175, n. 7, p. 453–461, 21 out. 2005.

SELINSKI, J. et al. Alternative oxidase isoforms are differentially activated by tricarboxylic acid cycle intermediates. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1423–1432, 1 fev. 2018.

SHEN, H. M.; PERVAIZ, S. Reactive oxygen species in cell fate decisions. In: **Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research**. [s.l.: s.n.].

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**, v. 110, n. 12, p. 4580–4585, 19 mar. 2013.

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, 1 fev. 2018.
- SIEKEVITZ, P. Powerhouse of the Cell. **Scientific American**, v. 197, n. 1, p. 131–144, 1957.
- SIERRA-CAMPOS, E. et al. Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions. **Mitochondrion**, v. 9, n. 2, p. 96–102, 1 abr. 2009.
- SKULACHEV, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 23–29, 1 jan. 2001.
- SLIP, D. J.; SHINE, R. Reptilian endothermy: a field study of thermoregulation by brooding diamond pythons. **Journal of Zoology**, v. 216, n. 2, p. 367–378, 1 out. 1988.
- SOKABE, T.; TOMINAGA, M. A temperature-sensitive TRP ion channel, Painless, functions as a noxious heat sensor in fruit flies. **Communicative & Integrative Biology**, v. 2, n. 2, p. 170, 2009.
- SOKOLOVA, I. Mitochondrial Adaptations to Variable Environments and Their Role in Animals' Stress Tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, v. 58, n. 3, p. 519–531, 1 set. 2018.
- SOTO, I. C. et al. Biogenesis and Assembly of Eukaryotic Cytochrome c Oxidase Catalytic Core. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1817, n. 6, p. 883, jun. 2012.
- SPEIJER, D. Oxygen radicals shaping evolution: Why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH<sub>2</sub>/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation. **BioEssays**, v. 33, n. 2, p. 88–94, fev. 2011.
- ST-PIERRE, J.; CHAREST, P. M.; 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**, v. 201, n. 21, p. 2961–2970, 1 nov. 1998.
- 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**, v. 5, n. 1, p. 8967, 29 jan. 2010.

- STEENKAMP, D. J.; HUSAIN, M. The effect of tetrahydrofolate on the reduction of electron transfer flavoprotein by sarcosine and dimethylglycine dehydrogenases. **Biochemical Journal**, v. 203, n. 3, p. 707, 1982.
- STEFANATOS, R.; SANZ, A. Mitochondrial complex I: a central regulator of the aging process. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 10, p. 1528–1532, 15 maio 2011.
- STENMARK, P.; NORDLUND, P. A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. **FEBS Letters**, 2003.
- SULLIVAN, L. B. et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 552, 7 jul. 2015.
- SUN, F. et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1043–1057, 1 jul. 2005.
- SZCZEPANOWSKA, K. et al. A salvage pathway maintains highly functional respiratory complex I. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2 abr. 2020.
- SZIBOR, M. et al. Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 10, n. 2, p. 163–171, 2017.
- SZIBOR, M. et al. Targeting the alternative oxidase (AOX) for human health and food security, a pharmaceutical and agrochemical target or a rescue mechanism? **Biochemical Journal**, v. 479, n. 12, p. 1337, 6 jun. 2022.
- TAKEUCHI, K. et al. Changes in Temperature Preferences and Energy Homeostasis in Dystroglycan Mutants. **Science**, v. 323, n. March, p. 1740–1743, 2009.
- TAN, J. L. et al. New High-Throughput Screening Identifies Compounds That Reduce Viability Specifically in Liver Cancer Cells That Express High Levels of SALL4 by Inhibiting Oxidative Phosphorylation. **Gastroenterology**, v. 157, n. 6, p. 1615–1629.e17, 1 dez. 2019.
- TATTERSALL, G. J. et al. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. **Science Advances**, v. 2, n. 1, 1 jan. 2016.
- TENNESSEN, J. M. et al. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 139–48, 2011.
- TENNESSEN, J. M. et al. Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. **G3: Genes, Genomes**,

**Genetics**, 2014.

TENNESSEN, J. M.; THUMMEL, C. S. Coordinating Growth and Review Maturation — Insights from *Drosophila*. **Current biology : CB**, v. 21, n. 18, p. R750, 27 set. 2011.

TEULIER, L. et al. Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1834, 2016.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341, 7 jul. 2018.

TIMÓN-GÓMEZ, A. et al. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis: Recent Developments. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 76, p. 163, 1 abr. 2018.

TRACHOOTHAM, D. et al. **Redox regulation of cell survival** **Antioxidants and Redox Signaling**, 2008.

TYLER, M. S. Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. In: **Developmental Biology, A Guide for Experimental Study**. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. **Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation** **Science**, 2009.

VILLENA, J. A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. **The FEBS journal**, v. 282, n. 4, p. 647–672, 2015.

WAGNER, A. M. et al. Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 993–1000, 1 jul. 2008.

WANG, H.; SIEMENS, J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal**, v. 2, n. 2, p. 178, 30 jun. 2015.

WANG, T.; MA, F.; QIAN, H. LI. Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 23, p. 82–95, 17 dez. 2021.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, 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**, 2006.

WATMOUGH, N. J.; FRERMAN, F. E. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. 2010.

WATSON, S. A.; MCSTAY, G. P. Functions of Cytochrome c Oxidase Assembly Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–18, 1 out. 2020.

WERNER, S.; NEUPERT, W. Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat-liver mitochondria. **European journal of biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 379–396, 1972.

WERNETTE, E.; OCHS, R. S.; LARDY, H. A. Ca<sup>2+</sup> Stimulation of Rat Liver Mitochondrial Glycerophosphate Dehydrogenase\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 24, p. 12767–12771, 1981.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2010 11:12**, v. 11, n. 12, p. 872–884, 23 nov. 2010.

WILSON, D. F. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 23, p. 7023–7038, 2017.

WOLF, A. et al. Toward high-throughput chip calorimetry by use of segmented-flow technology. **Thermochimica Acta**, v. 603, p. 172–183, 10 mar. 2015.

XUE, L.-L.; CHEN, H.-H.; JIANG, J.-G. Implications of glycerol metabolism for lipid production. 2017.

YANG, L.; VENNETI, S.; NAGRATH, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>, v. 19, p. 163–194, 20 jun. 2017.

YAO, C. H. et al. Uncoupled glycerol-3-phosphate shuttle in kidney cancer reveals that cytosolic GPD is essential to support lipid synthesis. **Molecular Cell**, v. 83, n. 8, p. 1340–1349.e7, 20 abr. 2023.

YEH, J. I.; CHINTE, U.; DU, S. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 9, p. 3280–3285, 4 mar. 2008.

YOSHIDA, M.; MUNAYUKI, E.; HISABORI, T. ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001 2:9**, v. 2, n. 9, p. 669–677, set. 2001.

ZEMIRLI, N.; MOREL, E.; MOLINO, D. Molecular Sciences Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. 2018.

ZHANG, B. BEI et al. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. **Familial Cancer**, v. 14, p. 19–23, 2015.

ZHAO, R. Z. et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p. 3–15, 2019.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2018.