

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 07/10/2025



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(β-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- α</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

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

## 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.

## 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 bc<sub>1</sub> 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 Q<sub>o</sub> 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 bc1 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.