

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2020.



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

Marina Minari Chioda

**Proteômica mitocondrial de *Drosophila melanogaster* expressando
a oxidase alternativa sob diferentes condições dietéticas**

São José do Rio Preto
2019

Marina Minari Chioda

**Proteômica mitocondrial de *Drosophila melanogaster* expressando
a oxidase alternativa sob diferentes condições dietéticas**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/02813-0

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto
2019

C539p Chioda, Marina Minari
Proteômica mitocondrial de *Drosophila melanogaster* expressando a oxidase alternativa sob diferentes condições dietéticas / Marina Minari Chioda. -- São José do Rio Preto, 2019
100 f. : il., tabs. + 1 CD-ROM

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

1. *Drosophila melanogaster*. 2. Restrição calórica. 3. Metabolismo energético. 4. Espectrometria de massa. 5. Bioquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Marina Minari Chioda

**Proteômica mitocondrial de *Drosophila melanogaster* expressando
a oxidase alternativa sob diferentes condições dietéticas**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/02813-0

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Nadia Monesi
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal
21 de fevereiro de 2019

Àqueles que sempre estiveram ao meu lado, que acreditaram
em mim e sempre me deram motivos pra continuar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que esteve ao meu lado todo tempo. Por ser minha certeza, amparo, proteção e fonte inesgotável de perseverança e sabedoria.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/02813-0.

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

Ao Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira, pela orientação, confiança, apoio e incentivo. Pelas oportunidades e pelos ensinamentos que vão além da vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Tiago Santana Balbuena, por sempre contribuir, esclarecer e ensinar de forma paciente e gentil.

Ao Prof. Dr. Marcus Fernandes Oliveira, ao Dr. Rafael Marini Ferreira e a Prof^a. Dr^a. Nadia Monesi, pelas ricas contribuições.

À Ms^a. Emily Anne McKinney, por toda dedicação, paciência e auxílio na obtenção dos dados de espectrometria de massas.

À Ms^a. Amanda Cristina Baldassi, por todo suporte e auxílio na análise dos dados de espectrometria de massas, na escrita e correção deste documento. Seu apoio foi imprescindível para a execução deste trabalho.

Ao Ms^e. André Ferreira de Camargo, pela amizade e auxílio na escrita e correção.

À Ms^a. Ana Paula Campos Rodrigues, pela amizade e auxílio na obtenção dos dados de PCR em tempo real.

À Geovana, por ter se tornado mais que uma amiga. Por ter me acolhido, ajudado e caminhado ao meu lado nesse período.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Mitochondrial por todos os bons momentos, ajudas, palavras e ombro amigo. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica Vegetal pelo acolhimento, por ouvirem meus desabaços, pelos ensinamentos, risos, cafés e momentos maravilhosos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biociências, pela participação na minha formação.

À minha família, em especial à minha mãe, por todo companheirismo, apoio, amor e cuidado.

Aos amigos que acreditaram em mim mais que eu mesma. Que por muitas vezes enxugaram as minhas lágrimas, me deram forças e não me deixaram desistir. Em especial à Flávia, Danielle, Caíque e Jacqueline.

RESUMO

O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial ocorre pela ação coordenada de cinco complexos multienzimáticos que formam a cadeia respiratória mitocondrial. Disfunções nesses complexos podem levar à deficiência na produção de ATP, além de uma formação excessiva de espécies reativas de oxigênio, fatores que se relacionam a uma grande quantidade de doenças. A oxidase alternativa mitocondrial (AOX) fornece uma via alternativa ao transporte de elétrons na cadeia respiratória, pois possui a função de química redox semelhante aos complexos III e IV. Quando expressa e testada em mitocôndrias de *Drosophila melanogaster*, camundongos e células humanas em cultura, que naturalmente não possuem esta enzima, houve diminuição dos efeitos deletérios resultantes de disfunções mitocondriais, indicando o seu potencial uso terapêutico. Entretanto, AOX não bombeia prótons para o espaço intermembranas, e sua expressão portanto pode reduzir o potencial de membrana e estar associada a um déficit bioenergético. Isso sugere a necessidade de dietas ricas em nutrientes para que a produção de ATP fora da mitocôndria seja significativa e suficiente para o desenvolvimento correto de organismos-modelo expressando a AOX. Para testar tal hipótese, ensaios de desenvolvimento usando drosófilas expressando AOX foram realizados com dieta rica e restrita em nutrientes e verificou-se que em condição de restrição nutricional, as moscas apresentaram queda de cerca de 80% na taxa de emergência dos adultos. Para compreender os mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo observado, investigamos o proteoma mitocondrial de pupas no estágio de pré-letalidade. Os dados obtidos de linhagens cultivadas em dieta rica em nutrientes mostram que enzimas relacionadas ao ciclo de Krebs e à oxidação de lipídeos estão superexpressas. Em combinação com a quantificação relativa do DNA mitocondrial, sugerimos que larvas expressando AOX possuem mais massa mitocondrial. Este mesmo padrão parece ser observado para moscas cultivadas em dieta restrita, indicando que AOX pode levar a um consumo mais proeminente, entretanto menos eficiente em termos bioenergéticos, dos estoques de lipídeos obtidos na fase de larva. Estes estoques podem ser insuficientes para a conclusão da metamorfose quando moscas AOX são submetidas a uma dieta restrita.

Palavras-chave: Mitocôndria. Oxidase Alternativa. *Drosophila melanogaster*. Proteômica. Fosforilação oxidativa.

ABSTRACT

The mitochondrial oxidative phosphorylation process occurs via the coordinated action of five multienzymatic complexes that constitute the mitochondrial respiratory chain. Dysfunction in these complexes can lead to deficiency in ATP production, in addition to excessive formation of reactive oxygen species, which are related to a large number of diseases. The alternative oxidase (AOX) provides an alternative pathway to electron transfer in the respiratory chain, since it possesses chemical redox function similar to that of complexes III and IV. When AOX was expressed and tested in mitochondria of *Drosophila melanogaster*, mice and human cells in culture, which naturally do not express this enzyme, there was a decrease in the deleterious effects resulting from mitochondrial dysfunction, indicating its potential therapeutic use. However, AOX does not pump protons into the intermembrane space, and thus may be associated with a decreased membrane potential and ATP production, suggesting the need for nutrient-rich diets for complete development of AOX-expressing model organisms. We conducted developmental assays using nutrient-rich and -restricted diets and we have verified that in the nutritional restriction condition AOX caused an 80% drop in eclosion rate. To understand the molecular mechanisms involved in the observed phenotype, we investigated the pupal mitochondrial proteome in the pre-lethality stage. Data obtained from lines cultivated in a nutrient-rich diet showed that the Krebs cycle and lipid catabolism enzymes are overexpressed. The same pattern was observed for diet-restricted flies, indicating that AOX may lead to a more prominent, but less efficient bioenergetically, consumption of lipid storage obtained in the larval phase. This storage may be insufficient for completing metamorphosis when the flies are cultured in restricted diet.

Keywords: Mitochondria. Alternative oxidase. *Drosophila melanogaster*. Proteomics. Oxidative phosphorylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da CR mitocondrial	18
Figura 2 – Representação esquemática da CR mitocondrial na presença de vias alternativas	20
Figura 3 – Moscas que expressam AOX em baixos níveis não apresentam problemas de desenvolvimento em dieta com baixo teor de nutrientes	29
Figura 4 – Moscas que expressam AOX em altos níveis apresentam sérios problemas de desenvolvimento em dieta com baixo teor de nutrientes	30
Figura 5 – Enriquecimento de proteínas mitocondriais nas amostras de Extrato Mitocondrial Puro	31
Figura 6 – Classificação das proteínas identificadas	33
Figura 7 – Mapas de Kegg (<i>Kegg maps</i>) da CR mitocondrial e do ciclo de Krebs	34
Figura 8 – Número de identificações do proteoma mitocondrial de duas linhagens de <i>D. melanogaster</i> submetidas à dieta padrão	35
Figura 9 – Identificação de peptídeos da AOX em drosófila via espectrometria de massas	37
Figura 10 – Nível de expressão das proteínas relacionadas ao ciclo de Krebs identificadas e das enzimas piruvato carboxilase e piruvato desidrogenase	38
Figura 11 – Nível de expressão das proteínas relacionadas ao catabolismo de lipídeos	39
Figura 12 – A proteína apolipoforina está subexpressa em linhagem expressando AOX	40

Figura 13 – Nível de expressão de enzimas estruturais mitocondriais em linhagem expressando AOX	41
Figura 14 – Linhagem expressando AOX apresenta aumento no nível relativo de DNAMt em larvas e pupas	42
Figura 15 – Abundância relativa das proteínas identificadas para ambas as linhagens submetidas a uma dieta com baixo teor de nutrientes	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das proteínas mais abundantes na linhagem que expressa AOX	43
Tabela 2 – Relação das proteínas mais abundantes na linhagem controle	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
AOX	Oxidase alternativa mitocondrial
CR	Cadeia respiratória mitocondrial
ADP	Difosfato de adenosina
ANDH	NADH-desidrogenase alternativa
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
DNAmt	DNA mitocondrial
DNA_n	DNA nuclear
FADH₂	Dinucleotídeo de flavina-adenina
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes</i>
LHON	<i>Leber's Hereditary Optic Neuropathy</i>
MERRF	<i>Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers</i>
ANT	Adenina nucleotídeo translocase
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
DTT	Dithiothreitol
EMC	Extrato mitocondrial cru
EMP	Extrato mitocondrial puro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
AmBic	Bicarbonato de amônio
PSM	<i>Peptide-spectrum match</i>
NSAF	<i>Normalized spectral abundance factor</i>
MAM	<i>Mitochondrial-associated membranes</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL.....	14
2.1	Objetivos específicos.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Mitocôndrias	15
3.2	Vias Metabólicas	16
3.3	Cadeia respiratória.....	17
3.4	Doenças mitocondriais.....	18
3.5	Enzimas alternativas	19
3.6	Uso de <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Linhagens Utilizadas.....	22
4.2	Dietas.....	22
4.3	Ensaio de desenvolvimento	22
4.4	Obtenção de Extrato Mitocondrial Puro	23
4.5	Processamento das proteínas do Extrato Mitocondrial Puro	24
4.6	Obtenção dos espectros.....	25
4.7	Identificação de proteínas	25
4.8	Quantificação relativa das proteínas diferencialmente expressas	26
4.9	Identificações do proteoma mitocondrial	26
4.10	Extração de DNA total.....	26
4.11	Quantificação relativa do DNAm.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	A taxa de emergência de moscas que expressam AOX em altos níveis é baixa em condição de restrição nutricional.....	28

5.2	Proteômica mitocondrial: as amostras são enriquecidas com proteínas mitocondriais.....	30
5.3	A maioria das proteínas identificadas são comuns para ambas as linhagens.....	35
5.4	Identificação da AOX.....	35
5.5	A linhagem expressando AOX apresenta níveis elevados de enzimas do ciclo de Krebs e do catabolismo de lipídeos, mesmo em dieta padrão	38
5.6	AOX pode elevar a massa mitocondrial, mesmo em dieta padrão	40
5.7	Resultados preliminares para as linhagens em dieta restrita	42
6	DISCUSSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE A – LISTA DE TODAS AS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA AS MOSCAS MANTIDAS EM DIETA PADRÃO	54
	APÊNDICE B – LISTA DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS PARA AS MOSCAS MANTIDAS EM DIETA PADRÃO	71
	APÊNDICE C – LISTA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA LINHAGEM QUE EXPRESSA AOX MANTIDA EM DIETA RESTRITA.....	73
	APÊNDICE D – LISTA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA LINHAGEM CONTROLE MANTIDA EM DIETA RESTRITA.....	84

1 INTRODUÇÃO

A cadeia respiratória mitocondrial (CR) sedia um dos processos energeticamente mais importantes para um organismo eucariótico, a fosforilação oxidativa. É na CR que os carreadores reduzidos provenientes da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas são reoxidados para obtenção da maior parte do trifosfato de adenosina (ATP) celular. A CR é formada por cinco complexos proteicos integrais de membrana, quatro realizando o transporte de elétrons em sequentes reações de oxirredução, e o quinto realizando o processo de fosforilação do ADP em ATP (CAMARGO *et al.*, 2018). A maioria dos grupos de eucariotos, incluindo animais, possuem enzimas que fornecem vias alternativas à CR, entretanto, vertebrados e insetos perderam os genes codificantes dessas enzimas ao longo da evolução (MCDONALD; GOSPODARYOV, 2018). Estas vias são constituídas pela oxidase alternativa (AOX) e pela NADH-desidrogenase alternativa (ANDH), que podem apresentar um papel importante na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na manutenção do potencial redox celular. A AOX atua transferindo elétrons do ubiquinol diretamente para O₂, contornando os Complexos III e IV, sendo então resistente aos seus respectivos inibidores, antimicina A e cianeto. Já a ANDH atua recebendo elétrons diretamente do dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADH), transferindo-os para a ubiquinona, e contornando então o Complexo I (CAMARGO *et al.*, 2018). A utilização das vias alternativas aparentemente só ocorre quando há comprometimentos da via clássica, que podem ser causados por diversos fatores, como elevado potencial de membrana, inibição por toxinas ou problemas genéticos associados aos Complexos I, III e IV (KEMPPAINEN *et al.*, 2014).

Testes da hipótese de que a enzima AOX, ao oferecer uma via alternativa ao transporte de elétrons da CR, poderia atuar no tratamento de diversas doenças humanas relacionadas a disfunções mitocondriais, tem gerado resultados positivos, negativos e inesperados (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2018). Quando o gene da AOX proveniente de *Ciona intestinalis* (Tunicata: Ascidiacea) foi expresso transgenicamente em células humanas em cultura, em camundongo e em *Drosophila melanogaster*, a enzima propiciou resistência a cianeto e diminuição da produção de EROs (DASSA *et al.*, 2009; EL-KHOURY *et al.*, 2013; FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009; HAKKAART *et al.*, 2006; SZIBOR *et al.*, 2017). Também foi possível observar que houve resgate de fenótipos deletérios comuns a

6 Discussão

Os resultados dos ensaios de desenvolvimento mostram que moscas que expressam AOX em altos níveis sofrem queda de cerca de 80% na sua taxa de emergência quando cultivadas em restrição alimentar. Esse resultado está de acordo com o esperado uma vez que por não bombear prótons, AOX poderia causar uma diminuição na quantidade de ATP mitocondrial produzida. Desse modo, levando-se em consideração que a AOX se torna ativa em condições de estresse nos organismos onde naturalmente é encontrada (DEL-SAZ *et al.*, 2017; SAHA; BOROVSKII; PANDA, 2016), ressalta-se a importância em se compreender quais são os reflexos desta nos organismos modelo quando submetidos a estresse nutricional. Antes, porém, é necessária tal caracterização nas condições padrão. Até então, a ação da expressão de AOX no fenótipo de moscas *D. melanogaster* cultivadas em dieta padrão, rica em carboidratos, era considerada praticamente inócua, excetuando-se o fato destas apresentarem um breve atraso no desenvolvimento e menor massa corpórea dos adultos jovens (FERNANDEZ-AYALA *et al.*, 2009). Visto que moscas AOX não apresentam fenótipos deletérios nesta condição, era esperado que a maior parte das proteínas identificadas neste trabalho fossem comuns às proteínas da linhagem controle. Os resultados obtidos mostraram que elas compartilham cerca de 80% das identificações, consistente com o esperado.

Além disso, conseguimos confirmar que nossas amostras de extratos mitocondriais puros estavam enriquecidas com proteínas mitocondriais: a maior parte das enzimas que participam da fosforilação oxidativa e do ciclo de Krebs foram identificadas, apesar das análises usando o software Blast2GO mostrarem uma abundância significativa de proteínas pertencentes ao sistema de endomembranas. Isto pode estar relacionado ao fato das membranas que constituem outras organelas, tais como complexo de Golgi e retículo endoplasmático, se associarem à membrana externa mitocondrial por processos fisiológicos ou por artefato gerado no momento da obtenção dos extratos proteicos. Por exemplo, as interações entre retículo endoplasmático e mitocôndria podem formar as MAMs (do inglês, *mitochondrial-associated membranes*) que são essenciais para a biogênese mitocondrial (LEWIS; TSAI; SU, 2016), processo que supostamente está em alta durante a fase final da metamorfose de *Drosophila*. No caso das proteínas de núcleo, citoplasma e as demais que não são mitocondriais, é mais provável que suas identificações sejam

consequência de impurezas das nossas amostras. Mesmo assim, a quantificação relativa do nosso marcador mitocondrial é de 2 a 3 vezes maior em relação ao marcador citoplasmático, assegurando então que trabalhamos com amostras enriquecidas e que as extrações de mitocôndrias foram relativamente bem executadas.

Uma análise mais detalhada da letalidade causada por AOX em condição de restrição nutricional mostra que o fenômeno é mais do que uma simples queda na taxa de emergência, já que as moscas AOX morrem em diferentes estágios da metamorfose (SAARI *et al.*, 2018). Tal fato indica que moscas AOX não são bloqueadas em momentos específicos do desenvolvimento, mas muito provavelmente tem seu desenvolvimento interrompido quando os nutrientes acumulados são completamente utilizados, não sendo suficientes para que haja a finalização da metamorfose. Partindo dessa premissa, observamos que, mesmo em dieta padrão, várias das enzimas que participam do ciclo de Krebs e um número significativo de enzimas envolvidas no catabolismo de lipídeos encontram-se em níveis mais elevados na linhagem que expressa AOX. Uma vez que no processo de metamorfose a via mais utilizada para geração de ATP é a de degradação de ácidos graxos, acumulados durante a fase de larva (MERKEY *et al.*, 2011), é esperado que as proteínas envolvidas nesse processo realmente tenham um maior nível de expressão. Os valores elevados na linhagem AOX reforçam a possibilidade de maior demanda e uso dos recursos estocados, indicando um aproveitamento menos eficiente das reservas energéticas nesta linhagem. Isto pode ser explicado caso a enzima AOX apresente alguma atividade mesmo nesta condição de dieta padrão. As vias de degradação dos triglicerídeos (β -oxidação e via da glicerol-3-fosfato desidrogenase) geram equivalentes redutores que entram na CR pelo Complexo I ou diretamente pelo ubiquinol (QH₂), e que são passados aos Complexos III e IV (segmento do citocromo c) com bombeamento de prótons através da membrana interna e a consequente produção de ATP. Caso a AOX apresente alguma atividade, esta estaria promovendo o desvio de elétrons do segmento do citocromo c, reduzindo O₂ e gerando um reduzido potencial de membrana, que levaria a uma diminuição na produção de ATP (CAMARGO *et al.*, 2018). Dessa forma a demanda por mais elétrons na CR pode aumentar, levando a necessidade de obtenção de mais carreadores reduzidos capazes de fornecerem tais elétrons para a produção de ATP suficiente. Diante disso, torna-se mais clara a interpretação dos resultados de que as enzimas que fazem parte

do ciclo de Krebs também estão presentes em maior quantidade. Ao que tudo indica, a quantidade de lipídeos estocada pelas moscas expressando AOX em dieta padrão é aparentemente suficiente para que elas completem a metamorfose. Por outro lado, a restrição nutricional pode limitar a estocagem de energia, a qual, por não ser eficientemente aproveitada pela linhagem AOX, resulta em letalidade. Levando em consideração que o meio restritivo é um fator estressor que pode levar ao aumento da atividade da AOX, esta situação se tornaria ainda mais aguda.

O fato das nossas amostras não serem 100% de mitocôndrias nos permitiu identificar e mostrar que os níveis da proteína apolipoforina estão mais baixos na linhagem que expressa AOX. Essa proteína quando associada a lipídeos é chamada de lipoforina, a maior lipoproteína da hemolinfa de drosófila. A lipoforina é responsável pela mobilização dos ácidos graxos acumulados no intestino, nos discos imaginais e no corpo gorduroso para suporte energético ao desenvolvimento das moscas nas fases não alimentar, como a fase de pupa (RODRÍGUEZ-VAZQUÉZ *et al.*, 2015). Era-se esperado que os níveis de apolipoforina estivessem mais elevadas na linhagem que expressa AOX, exatamente por atuar na mobilização dos ácidos graxos para a degradação. Entretanto, é possível que nossas amostras sejam de pupas AOX que já utilizaram quase todo estoque de lipídeos, e por isso os níveis da apolipoforina já estariam mais reduzidos do que no controle, sugerindo que a linhagem que expressa AOX também mobiliza os recursos numa velocidade mais acelerada. Em outras palavras, enquanto para a linhagem controle os estoques de lipídeos ainda estão sendo mobilizados e degradados neste ponto da metamorfose, para a linhagem expressando AOX a maioria dos recursos que estavam disponíveis já foram mobilizados e agora já estão nas vias de degradação para obtenção de energia.

Como AOX não bombeia prótons para o espaço intermembranas, é possível que a produção de ATP mitocondrial seja diminuída. Uma das maneiras do organismo contornar esse déficit bioenergético seria aumentando os locais de produção de ATP, via regulação positiva da glicólise e/ou da massa mitocondrial do organismo. Além de enzimas do ciclo de Krebs, cujos níveis são tradicionalmente usados como marcadores do aumento da biogênese mitocondrial, nossos resultados mostram que a abundância de ANT e porina também é maior em moscas AOX. Ambas são encontradas nas membranas da mitocôndria, sendo a primeira responsável pela troca de ADP e ATP através da membrana interna mitocondrial (ZHANG *et al.*, 1999) e a segunda pela formação de canais que permitem a maior parte do fluxo de metabólitos

pela membrana externa mitocondrial (ROSTOVTSEVA; COLOMBINI, 1996). A quantificação relativa do DNAm_t, que também pode ser usada como um parâmetro para quantificação da massa mitocondrial, mostra que moscas AOX tem um número mais elevado de cópias deste genoma, corroborando os dados proteômicos. Nossos resultados, portanto, indicam que é possível que haja um aumento da massa mitocondrial na linhagem que expressa AOX.

Apesar das análises prévias das amostras de moscas mantidas em dieta restrita não serem suficientes para fornecer evidências das vias que podem estar alteradas nessa condição, os resultados obtidos para uma única injeção no espectrômetro de massas fornecem pistas de que o padrão encontrado em dieta padrão se repete. É possível ver pela listagem das proteínas identificadas que as proteínas pertencentes a CR, ciclo de Krebs e β -oxidação são as mais abundantes para ambas. Entretanto, quando usamos a abundância relativa para fazer uma rápida comparação, observamos que na sua maioria, as proteínas estão mais abundantes na linhagem que expressa AOX, aparentemente corroborando o que foi levantado para dieta padrão. Nossos dados servirão para o entendimento dos mecanismos pelos quais AOX interfere com as mudanças metabólicas associadas às diferentes fases do desenvolvimento de *D. melanogaster*, as quais possuem paralelos com o desencadeamento e avanço de diversas doenças humanas (SAARI *et al.*, 2018).

Referências

- ANDJELKOVIĆ, A. *et al.* Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. **Scientific Reports**, London, v. 5, e18295, Dec. 2015.
- CAMARGO, A. F. D. *et al.* Xenotopic expression of alternative electron transport enzymes in animal mitochondria and their impact in health and disease. **Cell Biology International**, Oxford, v. 9999, p. 1-6, Jan. 2018.
- CHEN, Y.; ZHOU, Z.; MIN, W. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 9, p. 1-10, 2018.
- COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 10, p. 1842-1851, Sept. 2011.
- DASSA, E. P. *et al.* Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. **EMBO Molecular Medicine**, Weinheim, v. 1, n. 1, p. 30-36, Mar. 2009.
- DEL-SAZ, N. F. *et al.* An in vivo perspective of the role (s) of the alternative oxidase pathway. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 206-219, Mar. 2017.
- DOGAN, S. A. *et al.* Perturbed Redox Signaling Exacerbates a Mitochondrial Myopathy. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 28, p. 764-775, Nov. 2018.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Rockville, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.
- EL-HATTAB, A. W. *et al.* Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, Waltham, v. 125, n. 4, p. 315-321, 1 Dec. 2018.
- EL-KHOURY, R. *et al.* Alternative Oxidase Expression in the Mouse Enables Bypassing Cytochrome c Oxidase Blockade and Limits Mitochondrial ROS Overproduction. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e1003182, Jan. 2013.
- EL-KHOURY, R. *et al.* Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, Oxford, v. 171, n. 8, p. 2243-2249, Jan. 2014.
- FERNANDEZ-AYALA, D. J. *et al.* Expression of the *Ciona intestinalis* Alternative (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 449-460, May 2009.
- FERNÁNDEZ-MORENO, M. A. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 372, p. 33-49, 2007.

FUKUOH, A. *et al.* Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. **Molecular Systems Biology**, Chichester, v. 10, p. 734, 21 June, 2014.

GIORDANO, L. *et al.* Alternative Oxidase Attenuates Cigarette Smoke-Induced Lung Dysfunction and Tissue Damage. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, 19 Oct. 2018. In press.

GREAVES, L. C.; TAYLOR, R. W. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. **IUBMB Life**, Chichester, v. 58, n. 3, p. 143-151, May 2006.

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

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

JÖERS, P. *et al.* Mitochondrial Transcription Terminator Family Members mTTF and mTerf5 Have Opposing Roles in Coordination of mtDNA Synthesis. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e1003800, 19 Sept. 2013.

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

LEWIS, A.; TSAI, S.Y.; SU, T.P. Detection of Isolated Mitochondria-Associated ER Membranes Using the Sigma-1 Receptor. **Methods in Molecular Biology**. New York, v. 1376, p. 133–140, 2016.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

MCDONALD, A. E.; GOSPODARYOV, D. V. Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: Proposed physiological roles in animals. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 45, p. 7-17, 6 Feb. 2018.

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

MCFARLAND, R.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial Disease—Its Impact, Etiology, and Pathology. **Current Topics in Developmental Biology**, Maryland Heights, v. 77, p. 113-155, Jan. 2007.

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

MEHMOOD, S. *et al.* Charge Reduction Stabilizes Intact Membrane Protein Complexes for Mass Spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 136, n. 49, p. 17010-17012, Nov. 2014.

MERKEY, A. B. *et al.* Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 57, n. 10, p. 1437-1445, Nov. 2011.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014. 1220 p.

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

RAJENDRAN, J. *et al.* Alternative oxidase-mediated respiration prevents lethal mitochondrial cardiomyopathy. **EMBO Molecular Medicine**, Weinheim, v. 11, n. 1, p. e9456, Jan. 2019.

RODRIGUES, A. P. C. *et al.* Developmental arrest in *Drosophila melanogaster* caused by mitochondrial DNA replication defects cannot be rescued by the alternative oxidase. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 10882, July 2018.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. *et al.* *Drosophila* lipophorin receptors recruit the lipoprotein LTP to the plasma membrane to mediate lipid uptake. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e1005356, June 2015.

ROOTE, J.; PROKOP, A. How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 353–358, 1 Feb. 2013.

ROSTOVTSEVA, T.; COLOMBINI, M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 271, n. 45, p. 28006-28008, Nov. 1996.

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

SAARI, S. *et al.* Alternative respiratory chain enzymes: therapeutic potential and possible pitfalls. **Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, Oct. 2018. In press.

SAHA, B.; BOROVSKII, G.; PANDA, S. K. Alternative oxidase and plant stress tolerance. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 11, n. 12, p. e1256530, Nov. 2016.

SAZANOV, L. A. A. Giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 16, p. 375–388, May 2015.

SZIBOR, M. *et al.* Broad AOX expression in a genetically tractable mouse model does not disturb normal physiology. **Disease Models & Mechanisms**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 163-171, Feb. 2017.

VARTIAINEN, S. *et al.* Phenotypic rescue of a Drosophila model of mitochondrial ANT1 disease. **Disease Models & Mechanisms**, Cambridge, v. 7, n. 6, p. 635-648, Apr. 2014.

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