

**CENTRO UNIVERSITÁRIO IBMR
CURSO DE BIOMEDICINA**

THALITA DO CARMO LUCIO

**CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DOS MECANISMOS DE CONTROLE DO
ESTADO REDOX DE NAD EM DROSOPHILA MELANOGASTER**

RIO DE JANEIRO - RJ

2023

THALITA DO CARMO LUCIO

**CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DOS MECANISMOS DE CONTROLE DO
ESTADO REDOX DE NAD EM DROSOPHILA MELANOGASTER**

Trabalho apresentado ao Centro Universitário
IBMR como requisito de trabalho de conclusão
de curso de graduação em Biomedicina.

Orientador: Dr. Marcus Fernandes de Oliveira

RIO DE JANEIRO - RJ

2023

RESUMO

A mitocôndria é uma organela que exerce papel fundamental na homeostase energética celular através da produção de adenosina trifosfato (ATP). Esta organela é constituída por uma membrana externa e outra interna, sendo esta última extremamente seletiva e que permite a entrada de solutos somente através de carreadores específicos. Embora existam mecanismos que transportem NAD^+ para a matriz mitocondrial, o transporte de NADH é limitado pela inexistência de um carreador específico. Portanto, para que o potencial redox do NADH citosólico seja aproveitado na matriz mitocondrial, as células utilizam-se de vias cíclicas que regulam o equilíbrio redox citosólico e mitocondrial de NAD. Estas vias cíclicas são conhecidas como lançadeiras redox mitocondriais. As lançadeiras redox mitocondriais mais conhecidas na natureza são a glicerol-3-fosfato (GPSH) e a malato-aspartato (MASH) e juntamente com a enzima lactato desidrogenase (LDH), participam diretamente do controle do balanço redox de NAD citosólico e mitocondrial. No entanto, o conhecimento acerca das lançadeiras redox no organismo-modelo *Drosophila melanogaster* ainda é escasso. O presente projeto visa identificar e caracterizar os componentes moleculares pertencentes às lançadeiras GPSH e MASH, bem como da LDH da mosca *D. melanogaster*. Observamos que a *D. melanogaster* possui todos os componentes moleculares envolvidos em ambas as lançadeiras e duas isoformas de LDH. Algumas características importantes sobre estes mecanismos em *D. melanogaster* que diferem de outros organismos foram observados, tais como: i) a existência de três isoformas citosólicas (GPDH1, GPDH2 e GPDH3) e três mitocondriais (GPO1, GPO2 e GPO3) da enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase; ii) a presença de uma única isoforma do carreador aspartato-glutamato (SLC25A12) e a ausência do seu parólogo (SLC25A13); iii) a existência de três potenciais isoformas do carreador malato-oxoglutarato (SLC25A11). Além disso, suspeitamos que haja uma especificidade tecidual no tipo de mecanismo envolvido no controle do estado redox de NAD neste organismo. Neste sentido, a busca dos componentes da GPSH e MASH e da LDH no banco de dados transcriptômicos a nível tecidual gerados pelo nosso laboratório (Metabofly) revelou que a expressão dos componentes da GPSH e MASH, mas não da LDH, é muito alta na cabeça e no tórax. Por outro lado, a expressão de todos os componentes das duas lançadeiras é bastante baixa no ovário, sendo a LDH nula. Isto sugere que o principal mecanismo de controle do estado redox de NAD no ovário seja mediado pela ação conjunta de GPSH e MASH. Curiosamente, no testículo a expressão de todos os componentes das duas lançadeiras é também bastante baixa mas a LDH é expressa em níveis muito altos. O conjunto dos resultados apresentados indica que as lançadeiras redox

mitocondriais estão presentes em *D. melanogaster* e que há uma heterogeneidade tecidual nos mecanismos envolvidos no controle da homeostase redox de NAD neste modelo.

Palavras-chave: lançadeira-redox; NADH; glicerol-fosfato; malato-aspartato.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO.....	9
3. METAS.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSSÃO	18
7. BIBLIOGRAFIA	21

INTRODUÇÃO

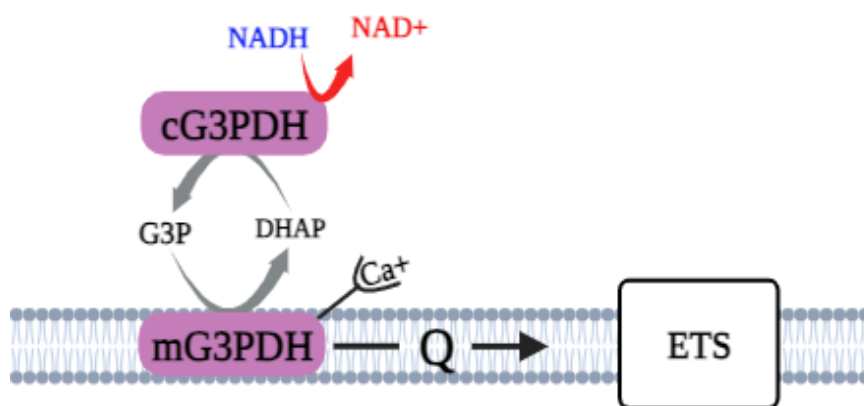
A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, tem sido utilizada como organismo modelo para análises de vários processos biológicos, genéticos, fisiológicos e outros. Alguns fatores contribuem para que a *Drosophila* viesse a ser um modelo recorrente nas pesquisas biomédicas, como: seu tempo de vida ser relativamente curto, seu manuseio ser de baixo custo, possuir alta taxa de reprodução e uma quantidade significativa de genes ortólogos com mamíferos (BURKE; ROSE, 2009; CHOLA et al., 2022; FLATT, 2020; GARCIA-SOUZA; OLIVEIRA, 2014; JORDAN et al., 2007). Sendo assim, é possível entender o funcionamento de vias bem estabelecidas, estudando processos equivalentes neste organismo modelo.

A mitocôndria é uma organela essencial que exerce papel fundamental na homeostase energética através da produção de adenosina trifosfato (ATP). Ela é constituída por duas membranas distintas denominadas membrana externa mitocondrial (MEM) e membrana interna mitocondrial (MIM), que compartilham e delimitam o espaço intermembrana. A MIM está organizada de forma compacta, dobrada para o interior da mitocôndria. As dobras acomodam os complexos do sistema de transporte de elétrons (ETS) e da síntese de ATP, que ocorre nas cristas mitocondriais. Além disso, a MIM é extremamente seletiva e permite apenas a passagem de solutos que tenham carreadores específicos (ARCHIBALD, 2015; MARTIN; GARG; ZIMORSKI, 2015, 2015; ROSSMANN et al., 2021; WOLF et al., 2019; ZIMORSKI et al., 2014). No entanto, uma molécula fundamental na transferência de energia em reações redox, o NADH, não possui carreador específico na MIM. Sendo assim, podemos pensar de que maneira o potencial redox extramitocondrial é aproveitado e transferido para o interior da matriz mitocondrial (BROEKS et al., 2021; RIGOLET et al., 2020).

Para estabelecer sua viabilidade, as células precisam que suas necessidades energéticas sejam mantidas. Neste sentido, é necessário que se tenha energia em forma de ATP, que pode ser obtido por meio da fosforilação oxidativa, através da oxidação de substratos oriundos do ciclo do ácido tricarboxílico ou da glicólise, vias metabólicas que alimentam o ETS. A maior parte da energia da transferência de elétrons é conservada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons, gerado através da MIM. Este processo se dá devido ao aproveitamento da energia do transporte de elétrons no bombeamento de prótons através da MIM resultando no acúmulo de prótons no espaço intermembrana. A energia que será acumulada sob a forma de gradiente eletroquímico de prótons impulsiona a atividade da ATP sintase mitocondrial (BONORA et al., 2012; FERNANDEZ-VIZARRA; ZEVIANI, 2021; LOPASCHUK et al., 2010; NEUFER, 2018; NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020). As lançadeiras redox mitocondriais são vias metabólicas cíclicas que fazem a transferência de potenciais redutores citosólicos do

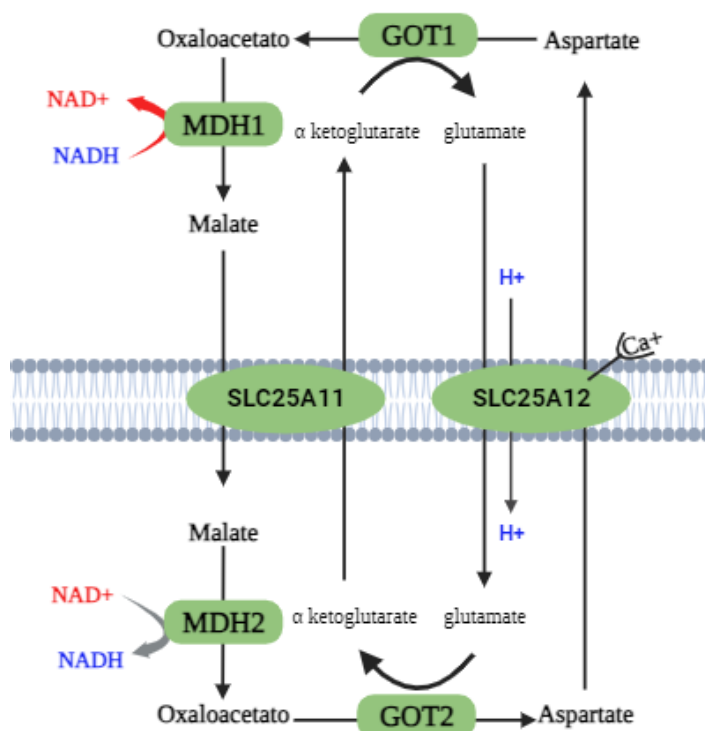
NADH para as mitocôndrias. Estas vias metabólicas funcionam como rotas de oxidação do NADH citosólico e transferência de elétrons para carreadores mitocondriais que serão encaminhados para o ETS. Destacamos neste projeto, duas lançadeiras: glicerol-fosfato (GPSH) e malato-aspartato (MASH). Na GPSH, os elétrons de NADH são transferidos para a dihidroxiacetona fosfato que será convertida em glicerol-3-fosfato (G3P). O G3P transferirá seus elétrons para FAD que será reduzido em FADH₂, que irá transferir os elétrons para a ubiquinona e o ETS. Na MASH, o NADH citosólico gerado pela glicólise é oxidado pela malato desidrogenase citosólica. O oxaloacetato é convertido em malato e será trocado por aspartato pelo carreador mitocondrial de malato-aspartato (BROEKS et al., 2021; GUO et al., 2018).

Apesar do entendimento de alguns processos metabólicos envolvendo as lançadeiras redox mitocondriais, ainda há uma grande lacuna do conhecimento acerca dos mecanismos de transferência do potencial redutor de NADH para o interior das mitocôndrias, isto se torna ainda mais importante se considerarmos o contexto tecidual, onde cada órgão possui demandas energéticas específicas e distintas para exercerem suas funções biológicas. Neste sentido, o presente projeto de pesquisa tem por objetivo determinar os componentes das lançadeiras redox mitocondriais glicerol-fosfato e malato-aspartato de diferentes tecidos da mosca *Drosophila melanogaster* em condições não estressoras. Sendo assim, visamos estabelecer os parâmetros cinéticos e físico-químicos das isoformas citosólicas e mitocondriais das enzimas malato desidrogenases, transaminase glutâmico-oxalacética e glicerol-3-fosfato desidrogenase, determinar os níveis de expressão de todos os componentes das GPSH e MASH e determinar os efeitos moduladores clássicos das GPSH e MASH (Ca⁺² e Citrato) nas atividades de glicerol-3-fosfato desidrogenase e malato desidrogenases.



Created in BioRender.com 

Figura 1 - Esquema representativo do mecanismo de funcionamento da lançadeira glicerol-fosfato



Created in BioRender.com 

Figura 2 - Esquema representativo do mecanismo de funcionamento da lançadeira malato-aspartato

OBJETIVO

Identificar todos os componentes das lançadeiras redox mitocondriais de diferentes tecidos da glicerol-fosfato (GPSH) e malato-aspartato (MASH) de diferentes tecidos da mosca *Drosophila melanogaster*.

METAS

- Identificar os genes codificantes de todos os componentes da GPSH e MASH em *D. melanogaster* utilizando ortólogos em humanos.
- Determinar as características estruturais de todos os componentes da GPSH e MASH em *D. melanogaster*.
- Determinar os níveis de expressão a nível tecidual de todos os componentes da GPSH e MASH em *D. melanogaster*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Análises bioinformáticas

As análises de bioinformática realizadas neste estudo estão esquematicamente descritas na figura abaixo. Os detalhes acerca das análises realizadas em cada etapa serão descritos ao longo do texto.

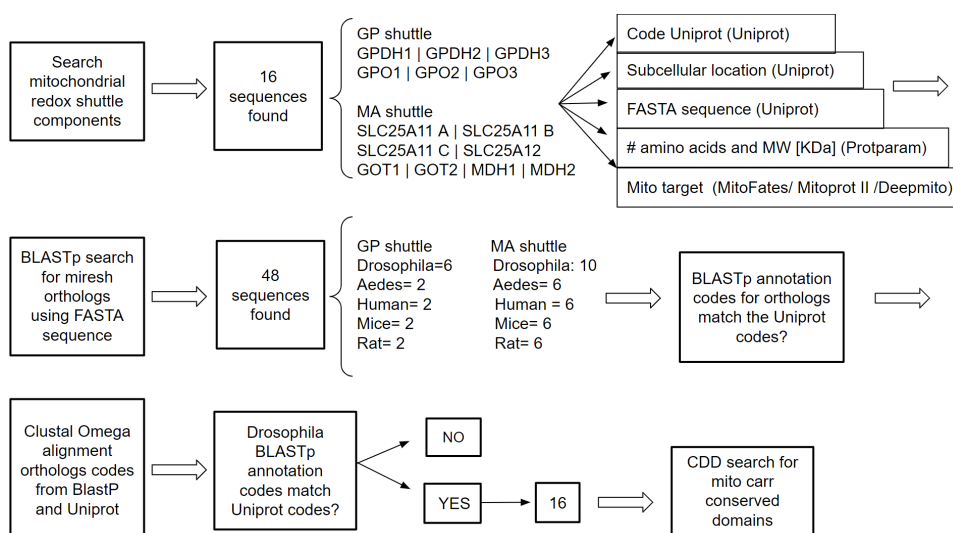


Figura 2 - O fluxograma apresentado acima representa o conjunto de análises bioinformáticas dos componentes da GPSH e MASH de *D. melanogaster*. A descrição aprofundada dos resultados obtidos das análises representadas na figura acima será apresentada ao longo do texto.

1.1. Determinação das características estruturais dos componentes das lançadeiras redox mitocondriais GPSH e MASH

O *FlyBase* (<https://flybase.org/>) é um banco de dados de bioinformática e o principal repositório de informações moleculares e genéticas dos insetos da família *Drosophilidae*. Utilizamos esta ferramenta para buscar as características estruturais básicas, como localização subcelular, código Uniprot, sequência e quantidade de aminoácidos e predição de localização mitocondrial dos componentes das lançadeiras GPSH e MASh na *D. melanogaster*. Utilizando os dados disponíveis no *FlyBase*, coletamos o código FBgn, código de identificação do gene e CG. O *FlyBase* possui botões de ação, destacando o que nos redireciona ao *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/>), que é um banco de dados que disponibiliza de forma gratuita informações de alta qualidade de genes, transcritos e proteínas e suas funções, onde grande parte das informações são oriundas do sequenciamento de genomas o que nos permite obter informações mais detalhadas de cada produto gênico. Neste banco, coletamos os dados de localização celular e sequência de aminoácidos, que é um formato para representação da sequência de nucleotídeos ou aminoácidos, nos quais os aminoácidos ou nucleotídeos, são representados por código de uma única letra.

A partir da coleta da sequência FASTA, utilizamos a ferramenta de bioinformática *Protparam* (<https://web.expasy.org/protparam/>), que nos permite obter a informação do peso molecular e da quantidade de aminoácidos. Esta ferramenta fornece também diversas informações, como as características bioquímicas das proteínas de interesse.

1.2. Predição da presença de sequência de endereçamento mitocondrial

Para determinação de endereçamento mitocondrial, foram utilizadas três ferramentas de bioinformática: *Deepmito* (<http://busca.biocomp.unibo.it/deepmito/>), *Mitofates* (<https://mitf.cbrc.pj.aist.go.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>) e *Mitoprot II* (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>). O funcionamento dessas ferramentas se dá da seguinte maneira: após a inserção da sequência FASTA da proteína de interesse, os sites retornam com informações sugestivas de endereçamento ou não mitocondrial. Sabendo que as lançadeiras GPSH e MASh têm parte dos seus componentes interagindo com o citosol, espaço intermembranas, a membrana interna mitocondrial e com a matriz mitocondrial, após a análise dos sites, determinamos quais destes elementos têm maior probabilidade de endereçamento mitocondrial levando em conta o funcionamento de cada lançadeira.

1.3. Busca de sequências ortólogas

Para a busca de sequências ortólogas, foi utilizada a plataforma *BLASTp*

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.) do *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que é uma ferramenta de busca e comparação de sequências biológicas contra um banco de dados que já possui informações e retorna segmentos mais similares relacionados à série pesquisada. Como critério de escolha dentro das sequências de ortólogo que o *BLASTp* retornou, determinamos que o E-value fosse $< 1e^{-30}$, query cover $> 50\%$ e percentual de identidade $> 30\%$. O E-value representa o número de alinhamentos diferentes por acaso. Portanto, para que o alinhamento seja mais significativo, o e-value precisa ser o mais próximo de zero. O query cover representa o percentual da série pesquisada que se sobrepõe à sequência que o *BLASTp* retornou. A identidade representa o percentual de aminoácidos idênticos na mesma posição nas sequências encontradas pelo *BLASTp* como retorno da série pesquisada. A partir destes filtros, selecionamos as sequências ortólogas de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Aedes aegypti*. Coletamos a sequência FASTA e código de identificação no *Uniprot* para todas as sequências ortólogas que compõem as lançadeiras redox GPSH e MASH.

1.4. Alinhamento múltiplo das sequências FASTA

Após a busca dos ortólogos, foi feito o alinhamento das sequências FASTA para determinação de regiões de assinatura e domínios das proteínas de interesse. Para isto, foi utilizada a ferramenta *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), um programa gratuito que possibilita o alinhamento múltiplo de sequências. Após a realização do alinhamento, o *Clustal Omega*, nos retorna, em forma de símbolos (:./*), informações importantes entre as sequências alinhadas. O asterisco (*) indica as posições que possuem um único resíduo totalmente conservado, os dois pontos (:) indicam conservação entre grupos químicos de propriedades fortemente semelhantes e o ponto (.) indica conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes.

1.5. Busca por regiões de assinatura

Para determinação de regiões de assinaturas, também conhecidas como domínios conservados, foram utilizados o *CDD* (*Conserved Domain Database*) *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) que é uma ferramenta de pesquisa de domínios conservados em sequências de resíduos específicos das proteínas-alvo ou nucleotídeos em banco de dados e o *Scanprosite* (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) que consiste em uma ferramenta de busca de motivos e domínios de proteínas, famílias e locais funcionais, bem como padrões e perfis associados para identificá-los na base de dados.

1.6. Determinação de predição de fosforilação de proteínas

A determinação de predição de fosforilação de proteínas foi coletada a partir do *Scanprosite* (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) que consiste em uma ferramenta de busca de motivos e domínios de proteínas, famílias e locais funcionais, bem como padrões e perfis associados para identificá-los na base de dados. Coletamos essas informações no Scanprosite os sítios de fosforilação e as quinases envolvidas.

RESULTADOS

Organism	Miresh components	Gene name	GeneID	Uniprot	MW (Kda)	#aa	Query cover	E-value	% Ident	Uniprot predicted location
Drosophila melanogaster	GP shuttle									
	GPDH1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	33824	P13706	39.7	363	100%	3 e-158	66%	Cytosolic
	GPDH2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	37672	Q9W1U3	40.08	358	98%	8 e-112	45%	Cytosolic
	GPDH3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 3	42624	Q8IN06	146.28	1304	26%	2 e-90	44%	Cytosolic
	GPO1	Glycerophosphate oxidase 1	47611	Q7K569	80.42	724	97%	0	62%	Mitochondrion
	GPO2	Glycerophosphate oxidase 2	35689	A1Z707	79.75	713	*			Mitochondrion
	GPO3	Glycerophosphate oxidase 3	34776	Q7KTA9	68.8	626	*			Mitochondrion
Homo sapiens	GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	2819	P21695	37.56	349	96%	1 e-163	66%	Cytosolic
	GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	2820	P43304	80.85	727	97%	0	62%	Mitochondrion
Organism	Miresh components	Gene name	GeneID	Uniprot	MW (Kda)	#aa	Query cover	E-value	% Ident	Uniprot predicted location
Drosophila melanogaster	MA shuttle									
	SLC25A11 A	-	43483	Q9VAJ9	34.61	317	94%	3 e-126	59%	Mitochondrion inner membrane
	SLC25A11 B	-	38571	Q9VZ94	33.11	301	95%	7 e-105	54%	Mitochondrion inner membrane
	SLC25A11 C	-	38572	Q9VZ93	34.37	311	95%	6 e-116	54%	Mitochondrion inner membrane
	SLC25A12	Aralar 1	43616	Q9VA73	76.75	695	95%	0	58%	Mitochondrion inner membrane
	MDH1	Malate dehydrogenase 1	34414	Q9VKX2	36.05	337	99%	8 e-153	66%	Cytosolic
	MDH2	Malate dehydrogenase 2	42185	Q9VEB1	35.31	336	98%	1 e-147	59%	Mitochondrion
	MDH2	Malate dehydrogenase 2	39470	Q9VU29	36.73	347	88%	3 e-108	51%	Mitochondrion
	MDH2	Malate dehydrogenase 2	39489	Q9VU28	36.78	349	94%	6 e-101	44%	Mitochondrion
	GOT1	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	36782	A1ZAA5	48.57	437	98%	3 e-170	56%	Cytosolic
	GOT2	Glutamate oxaloacetate transaminase 2	33373	Q8IPY3	48.17	431	95%	0	63%	Mitochondrion
	SLC25A11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	8402	Q02978	34.06	314	94%	3 e-126	59%	Mitochondrion inner membrane
	SLC25A12	Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A12, mitochondrial	8604	Q75746	74.76	678	95%	0	58%	Mitochondrion inner membrane
	SLC25A13	Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A13, mitochondrial	10165	Q9UJS0	74.17	675	*			Mitochondrion inner membrane
Homo sapiens	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4190	P40925	36.42	334	98%	2 e-160	66%	Cytosolic
	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	4191	P40926	35.5	338	99%	2 e-149	59%	Mitochondrion matrix
	GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2805	P17174	46.24	413	94%	1 e-167	56%	Cytosolic
	GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	311	P00505	47.51	430	95%	0	63%	Mitochondrion matrix

Tabela 1. A tabela acima apresenta informações moleculares dos componentes da GPSH e MASH de *D. melanogaster* obtidas através das ferramentas FlyBase, Uniprot, BLASTp e Protparam. Nas caixas brancas, estão representados os componentes de *D. melanogaster* e nas caixas cinza, os ortólogos humanos. Os resultados obtidos nesta tabela são aprofundados ao longo do texto.

Na tabela 1 estão reunidas e organizadas as informações oriundas das ferramentas bioinformáticas *FlyBase*, *Uniprot*, *BLASTp* e *Protparam* de todos os componentes da GPSH e MASH de *D. melanogaster* identificados. Neste trabalho, identificamos todos os componentes das GPSH e MASH em *D. melanogaster*. Ademais, observamos outras características interessantes nestas análises, por exemplo, a existência de três isoformas citosólicas (GPDH1, GPDH2 e GPDH3) e três mitocondriais (GPO1, GPO2 e GPO3) da enzima de glicerol 3 fosfato desidrogenase. Essa característica difere notadamente de outros organismos, uma vez que em humanos encontramos uma isoforma citosólica e uma mitocondrial. Ainda se tratando dos componentes da GPSH, GPD1 é o ortólogo humano correspondente da isoforma

citossólica GPDH1 e GPD2 corresponde a GPO1 isoforma mitocondrial em *Drosophila*. Na busca de ortólogos humanos para os componentes identificados na mosca da fruta, observamos que das três potenciais isoformas mitocondriais da enzima glicerol-fosfato desidrogenase apenas GPO1 retorna ortólogo humano enquanto GPO2 e GPO3 não retornam. Tratando-se dos componentes da MASH, observamos na mosca da fruta, a presença de uma única isoforma do carreador aspartato-glutamato (SLC25A12) e a ausência de seu parálogo (SLC25A13) conforme encontramos em humanos; a existência de três potenciais isoformas do carreador malato-oxoglutarato (SLC25A11) distinguindo do encontrado em humanos e a existência de três potenciais isoformas da enzima malato desidrogenase mitocondrial (MDH2).

De maneira geral, os demais componentes de GPSH e MASH se mostraram muito semelhantes em relação aos ortólogos humanos. Desta forma, podemos concluir que a arquitetura das lançadeiras redox mitocondriais em *D. melanogaster* distingue-se de maneira ímpar da arquitetura já vista em humanos.

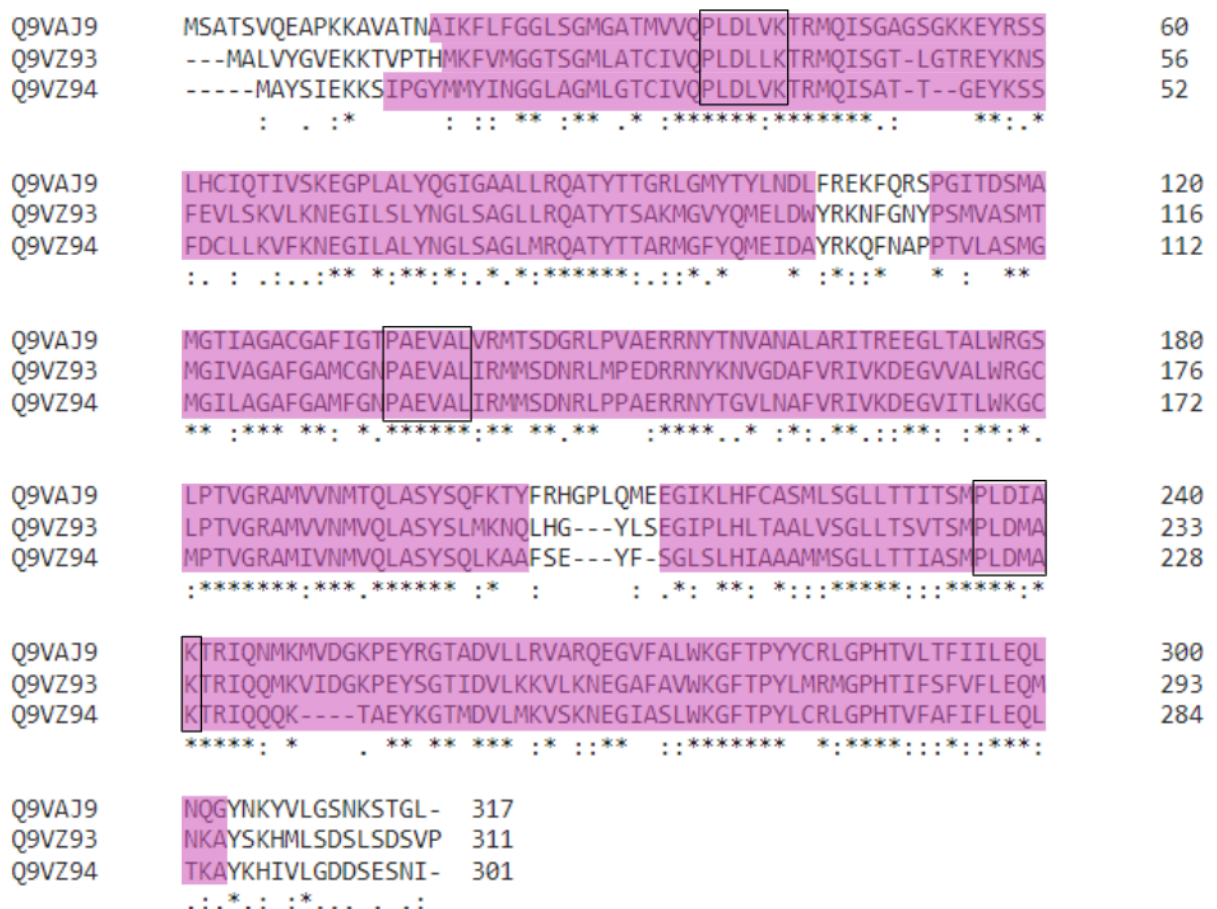


Figura 3 - Esta figura refere-se a um alinhamento no Clustal Omega das três potenciais sequências codificantes

do carreador SLC25A11, sendo uma característica única das lançadeiras redox mitocondriais em *D. melanogaster*. Em lilás, estão destacadas a região de assinatura da família de transportadores mitocondriais SLC25, que ficam localizadas nas hélices ímpares de cada domínio representadas pela sequência consenso Px[DE]xx[KR] que está destacada na caixa preta (RUPRECHT; KUNJI, 2020).

Na figura 3, considerando a existência de três potenciais isoformas do carreador malato-oxoglutarato (SLC25A11), fomos buscar regiões de assinatura e domínios destes carreadores já descritas anteriormente na literatura. A família de transportadores mitocondriais SLC25 possui uma organização ancestral comum, composta por três sequências de aminoácidos repetidas, regiões altamente conservadas conhecidas por domínios conservados. Estes domínios compõem uma estrutura de três domínios que juntos formam uma interface de dimerização. Estão localizados nas alfa hélices transmembranas ímpares, este motivo caracteriza-se pela sequência PX[D/E]XX[K/R] (RUPRECHT; KUNJI, 2020). Para nos certificarmos da existência de três possíveis codificantes de SLC25A11, buscamos as regiões citadas anteriormente. Alinhamos as três sequências encontradas e em lilás, apresentamos as regiões de domínio conservada da família de transportadores mitocondriais SLC25, envoltos pela linha preta os motivos característicos dos carreadores mitocondriais localizados nas hélices ímpares de cada domínio representadas pela sequência consenso Px[DE]xx[KR]. Podemos observar que, as três sequências alinhadas possuem as regiões SOLCAR e o motivo da família dos carreadores mitocondriais. Desta forma, concluímos que *D. melanogaster* possui três potenciais isoformas do carreador malato-oxoglutarato, validando mais uma vez a arquitetura única dos componentes das lançadeiras redox mitocondriais neste modelo.

Dm_Q9VZ94	-----MAYSIEKKSIPGYMMYINGGLAGMLGTCIVCPDLVVKTRMQISATT---GE	48
Dm_Q9VZ93	-----MALVYGVEKKTVPTHMKFVMGGTSGMLATCIVCPDLCLKTRMQISGTL-GTRE	52
Hs_Q02978	MAATASAGAGGIDGKPRTSPPKSVKFLFGGLAGMGATVFVCPDLVVKTRMQISGEGAKTRE	60
Mm_Q9CR62	MAATASPGAGRMDGKPRTSPPKSVKFLFGGLAGMGATVFVCPDLVVKTRMQISGEGAKTRE	60
Rn_P97700	MAATASPGAGRMDGKPRTSPPKSVKFLFGGLAGMGATVFVCPDLVVKTRMQISGEGAKTRE	60
Dm_Q9VAJ9	MSAT----SVQEAPKKAVATNAIKFLFGGLSGMGATMVVCPDLVVKTRMQISGAGSGKKE	56
Aa_J9HS73	-----MGDKKKPVYIQYLFGGLSGIGATCVVCPDLVVKTRMQISGIGGAVKE	47
	: : : * : * : * : * : * : * : *	
Dm_Q9VZ94	YKSSFDCLLKVFKNNEGILALYNGLSAGLMRQATYTTARMGFYQMEIDAYRKQFNAPPTVL	108
Dm_Q9VZ93	YKNSFEVLSKVLKNEGILSLYNGLSAGLLRQATYTSAKMGVYQMELDWYRKNFGNYPMSV	112
Hs_Q02978	YKTSFHALTSILKAELRGIYTGLSAGLLRQATYTTTRLGIYTVLFERLTGADGTPPGFL	120
Mm_Q9CR62	YKTSFHALTSILKTEGLKGIYTGLSAGLLRQATYTTTRLGIYTVLFERLTGADGTPPGFL	120
Rn_P97700	YKTSFHALTSILKAELRGIYTGLSAGLLRQATYTTTRLGIYTVLFERLTGADGTPPGFL	120
Dm_Q9VAJ9	YRSSLHCITIVSKEGPLALYQIGIGALLRQATYTTGRLGMYTYLNDLFREKFQSPGIT	116
Aa_J9HS73	YNNTFDAIGKIIKREGPLALYKGLSAAIMRQATYTTTRLGVYTSLNDAIKQKMNKAPNLL	107
	* : : : * : : : * : : * : : * : : * : : *	
Dm_Q9VZ94	ASMGMGILAGAFGAMFGMPAEVALIRMSDNRLPPAERRNYTGVNFAFVRIKDEGVITL	168
Dm_Q9VZ93	ASMTMGIVAGAFGAMCGMPAEVALIRMSDNRLMPEDRRNYKNVGDAFVRIKDEGVVAL	172
Hs_Q02978	LKAVIGMTAGATGAFVGTPAEVALIRMTADGRLPADQRRGYKNVFNALIRITREEGVLT	180
Mm_Q9CR62	LKALIGMTAGATGAFVGTPAEVALIRMTADGRLPADQRRGYKNVFNALVRIAREEGVPTL	180
Rn_P97700	LKALIGMTAGATGAFVGTPAEVALIRMTADGRLPADQRRGYKNVFNALIRIAREEGVPTL	180
Dm_Q9VAJ9	DSMAMGTIAGACGAFIGTPAEVALVRMTSDGRLPVAERRNYTNVANALARITREEGLTAL	176
Aa_J9HS73	ESMAMGMTAGAVGSFVGMPCELIILIRMTADGRLPVAERRNYTNFFNAFLRIAREEGMFAL	167
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Dm_Q9VZ94	WKGCMPTVGRAMIVNMVQLASYSQKAAFS---EYF-SGLSLHIAAAMMSGLLTITIASMP	224
Dm_Q9VZ93	WRGCLPTVGRAMVVNMVQLASYSQKQQLH---GYLSEGIPLHLTAALVSGLLTSVTSMP	229
Hs_Q02978	WRGCIPTHARAVVVNAAQLASYSQSKQFLLDG-GYFSDNILCHFCASMSISGLVTTAASMP	239
Mm_Q9CR62	WRGCIPTHARAVVVNAAQLASYSQSKQFLLDG-GYFSDNILCHFCASMSISGLVTTAASMP	239
Rn_P97700	WRGCIPTHARAVVVNAAQLASYSQSKQFLLDG-GYFSDNILCHFCASMSISGLVTTAASMP	239
Dm_Q9VAJ9	WRGSLPTVGRAMVVNMTQLASYSQKFTYFRHGPLQMEEGIKLHFCASMSGLLTITISMP	236
Aa_J9HS73	WRGCIPTHGRAMVVNAAQLASYSQAKSYLVSS-GHFTGEGIALHFTASMFSGLITTAASLP	226
	* : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
Dm_Q9VZ94	LDMAKTRIQQKQK-----TAEYKGTMDVLMKVSKNEGIASLWKGFTPYLCRLGPHTVFAFI	279
Dm_Q9VZ93	LDMAKTRIQQMKVIDG-KPEYSGTIDVLLKKVLKNEGAFAVWKGFTPYLMRMGPHTIFSFI	288
Hs_Q02978	VDIAKTRIQNMRRMIDG-KPEYKNGLDVLLKVVRYEGFFSLWKGFTPYARLGPHTVLTFI	298
Mm_Q9CR62	VDIVKTRIQNMRRMIDG-KPEYKNGLDVLLKVVRYEGFFSLWKGFTPYARLGPHTVLTFI	298
Rn_P97700	VDIVKTRIQNMRRMIDE-KPEYKNGLDVLLKVVRYEGFFSLWKGFTPYARLGPHTVLTFI	298
Dm_Q9VAJ9	LDIAKTRIQNMKRVMDG-KPEYRGTAADVLLRVARQEGVFALWKGFTPYCRLGPHTVLTFI	295
Aa_J9HS73	VDIAKTRIQNMKVAAGEVPPYKNTIDVIVKVVREHIGIFALWKGFTAYYARLGPHTVLTFI	286
	* : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
Dm_Q9VZ94	FLEQLTKAYKHIVLGDDSESNI-	301
Dm_Q9VZ93	FLEQMINKAYSKHMLSDSLSDSP	311
Hs_Q02978	FLEQMINKAYKRLFLSG-----	314
Mm_Q9CR62	FLEQMINKAYKRLFLSG-----	314
Rn_P97700	FLEQMINKAYKRLFLSG-----	314
Dm_Q9VAJ9	ILEQLNQGYNKYVLGSNKST-GL	317
Aa_J9HS73	LLEQLNGLYNQHFMGGKGSKSGL	309
	: * : : * : : * : : * : : * : : *	

Figura 4 - A figura acima apresenta um alinhamento no Clustal Omega das sequências dos carreadores SLC25A11 de *D. melanogaster* (Dm) e dos ortólogos *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rattus norvegicus* (Rn) e *Aedes Aegypti* (Aa). Em lilás, estão destacadas a região de assinatura da família de transportadores mitocondriais SLC25, que ficam localizadas nas hélices ímpares de cada domínio representadas pela sequência consenso Px[DE]xx[KR] que está destacada na caixa preta (RUPRECHT; KUNJI, 2020).

Na figura 4, temos o alinhamento múltiplo das sequências de SLC25A11 em *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Aedes aegypti* utilizando a ferramenta Clustal Omega. Para nos certificarmos de que encontramos nos ortólogos as isoformas de SLC25A11, bem como em *Drosophila*, alinhamos todas as possíveis sequências encontradas e buscamos por domínios conservados. Observamos que as possíveis isoformas encontradas nos ortólogos possuem assim como as sequências de *D. melanogaster* as regiões conservadas da família de transportadores mitocondriais SLC25A. Além disso, vimos que na terceira hélice, há uma modificação da sequência consenso presente em todas as sequências de SLC25A11, onde haveria uma lisina (K) ou arginina (R), há uma leucina (L).

<i>Drosophila melanogaster</i> (MetaboFly)							
GP shuttle		Flybase Transcript	Gene Name	Thorax	Head	Ovary	Testis
GPDH1	FBgn0001128	FBtr0079147	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase cytoplasmic	446,88	139,36	0,00	0,00
		FBtr0079148	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase cytoplasmic	0,08	47,48	0,00	10,88
GPDH2	FBgn0034825	FBtr0071974	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase cytoplasmic	3,83	0,21	0,00	41,88
GPDH3	FBgn0263048	FBtr0306945	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase cytoplasmic	8,02	5,46	12,71	36,50
GPO1	FBgn0022160	FBtr0087307	Glycerophosphate oxidase 1	157,71	109,63	7,49	4,68
GPO2	FBgn0033190	FBtr0088907	Glycerophosphate oxidase 2	3,03	0,13	0,08	32,21
		FBtr0305567	Glycerophosphate oxidase 2	4,37	0,00	0,00	112,98
GPO3	FBgn0028848	FBtr0310273	Glycerophosphate oxidase 3	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 2 - Na tabela acima, observamos a avaliação do nível de expressão gênica tecido-específico dos componentes da GPSH em diferentes tecidos em *Drosophila melanogaster* utilizando a plataforma MetaboFly.

O MetaboFly é uma plataforma que teve origem a partir de uma base de dados de transcriptômica com resolução tecidual de genes codificantes relacionados às vias do metabolismo energético em *Drosophila melanogaster* gerada pelo aluno de pós-graduação Yan Aveiro do nosso laboratório (dados não publicados). A busca dos dados brutos para o MetaboFly foi realizada em dois bancos de dados com informações de RNA-seq disponíveis (FlyAtlas 2 e modENCODE) (BOLEY et al., 2014; CHEN et al., 2014; KRAUSE et al., 2022; ROBINSON et al., 2013), onde os genes selecionados, tinham envolvimento com as vias do metabolismo energético. Para determinar a expressão tecido-específica dos transcritos foram utilizados softwares que avaliam padrões de expressão em TPM (transcritos por milhão) e os tecidos escolhidos são tórax, cabeça, ovário e testículo. Em seguida, foi realizada a avaliação e verificação de transcritos relacionados e a normalização dos dados por deduplicação, que é um tipo de normalização feita a partir de genes que possuíam os mesmos níveis de expressão em TPM nos 4 tecidos. Sendo assim, estes genes foram considerados cópias, pelas técnicas de detecção utilizadas, já que não possuíam resolução suficiente para identificar diferenças nos valores de expressão entre eles.

Interessados no controle redox de NAD e em posse das sequências de todos os componentes das GPSH e MASH identificados na tabela 1, buscamos os níveis de expressão destes componentes utilizando a plataforma MetaboFly.

Altos níveis de expressão de transcritos dos componentes da GPSH podem ser observados na cabeça e no tórax, utilizando GPD1 citosólica e GPO1 mitocondrial, o que nos possibilita sugerir fortemente que a funcionalidade da GPSH se dá prioritariamente nestes tecidos em *D. melanogaster*. Já foi demonstrado na literatura que no músculo de voo de insetos há um aumento da taxa respiratória quando o substrato oxidável utilizado é o glicerol-3-fosfato (MENAIL et al., 2022), o que corrobora com os dados expressos na tabela 2. Nos tecidos reprodutivos, a expressão dos componentes desta lançadeira são pouco expressos. No ovário a expressão de quase todos os componentes é zero e no testículo, a atividade desta lançadeira deve ser relativamente baixa porque a expressão é baixa e usa isoformas diferentes de GPO mitocondriais, especialmente GPO1 e GPO2.

<i>Drosophila melanogaster</i> (MetaboFly)							
MA shuttle	Gene code	Flybase Transcript	Gene Name	Thorax	Head	Ovary	Testis
SLC25A11	FBgn0039674	FBtr0085447	Slc25a11 (2-oxoglutarate/malate carrier)	64,07	48,22	29,33	4,93
	FBgn0035568	FBtr0073366	Slc25a11 (2-oxoglutarate/malate carrier)	5,85	0,38	0,00	92,30
	FBgn0035567	FBtr0073367	Slc25a11 (2-oxoglutarate/malate carrier)	2,70	0,00	0,00	21,34
SLC25A12	FBgn0028646	FBtr0085692	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	0,00	30,88	0,00	0,00
		FBtr0085693	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	19,93	11,58	1,34	2,18
		FBtr0306586	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	0,00	7,21	0,00	0,14
		FBtr0330290	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	59,99	27,69	14,78	1,44
MDH1	FBgn0262782	FBtr0080050	Malate dehydrogenase 1	577,30	430,69	312,24	30,56
	FBgn0036327	FBtr0075900	malate dehydrogenase 2	0,85	0,00	0,00	16,03
MDH2	FBgn0036328	FBtr0075871	malate dehydrogenase 2	4,27	0,00	0,00	65,07
	FBgn0262559	FBtr0083563	malate dehydrogenase 2	444,34	406,19	320,87	35,34
GOT1	FBgn0001124	FBtr0087231	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	67,31	12,77	5,05	195,98
GOT2	FBgn0001125	FBtr0077867	Glutamate oxaloacetate transaminase 2	430,93	340,56	306,97	16,29
		FBtr0077868	Glutamate oxaloacetate transaminase 2	0,00	0,79	0,00	83,09

Tabela 3 - Na tabela acima, observamos a avaliação do nível de expressão gênica tecido-específico dos componentes da MASH em diferentes tecidos em *Drosophila melanogaster* utilizando a plataforma MetaboFly

A lançadeira malato-aspartato parece ser um mecanismo de suma importância para o tórax e a cabeça pois o nível de expressão dos componentes nestes tecidos se apresenta regular. De maneira geral, ainda que algum componente que possua mais de um transcrito apresente um algum com expressão baixíssima ou zero, um outro que possui expressão regular pode ser expresso, o que sugere que no tórax ou na cabeça a MASH seja funcional. No ovário, podemos observar que há uma diversidade nos níveis de expressão, destacamos a expressão baixíssima do transcrito de GOT1, sugerindo portanto que este componente pode ser limitante e comprometa a funcionalidade de MASH no ovário. No testículo, os níveis de expressão dos componentes da MASH apresentam-se regulares, contudo, há um componente que apresenta

níveis baixíssimos em todos os transcritos, SLC25A12 o que nos permite sugerir que ele seja limitante para a funcionalidade de MASH neste tecido.

<i>Drosophila melanogaster</i> (MetaboFly)							
Enzyme	Gene code	Flybase Transcript	Gene Name	Thorax	Head	Ovary	Testis
LDH	FBgn0001258	FBtr0077008	Lactate dehydrogenase	20,10	17,49	0,32	30,20
LDH	FBgn0033856	FBtr0087677	L-lactate dehydrogenase isoform B	1,63	0	0	36,01

Tabela 4 - Na tabela acima, observamos a avaliação do nível de expressão gênica tecido-específico dos transcritos das isoformas da enzima lactato desidrogenase em diferentes tecidos em *Drosophila melanogaster* utilizando a plataforma MetaboFly.

Um outro mecanismo envolvido na reciclagem de NAD + é mediado pela atividade de enzima lactato desidrogenase. A LDH catalisa a reação reversível de redução do piruvato a lactato utilizando o NAD como molécula transferidora de elétrons.

Observamos na tabela 4 que os tecidos com alta demanda energética como cabeça e tórax possuem uma expressão relativamente alta da LDH o que sugere que estes tecidos utilizem este mecanismo para o controle da homeostase redox de NAD. No testículo há uma expressão mais alta de LDH que nos outros tecidos. Sendo assim, sugerimos que a atividade da enzima lactato desidrogenase é o mecanismo preferencial deste tecido para aproveitamento do potencial redox enquanto o ovário possui uma expressão muito baixa nos permitindo inferir que este mecanismo não é relativamente funcional neste tecido.

DISCUSSÃO

As lançadeiras redox mitocondriais são vias cíclicas fundamentais no controle da homeostase redox de NAD e dos níveis de metabólitos importantes no citosol e na mitocôndria. A regulação do metabólito glicerol-3-fosfato, por exemplo, conecta três vias diferentes: glicólise, lipogênese e fosforilação oxidativa. A atividade das lançadeiras permite o aproveitamento do potencial redox citosólico na matriz mitocondrial por meio de reações de oxirredução. As lançadeiras glicerol-3-fosfato (GPSH) e malato-aspartato (MASH) já foram descritas anteriormente na literatura (BORST, 2020) e apesar de terem seus mecanismos conhecidos, há uma lacuna no conhecimento em relação às características dos seus respectivos componentes em *Drosophila melanogaster*, como a existência de três isoformas citosólicas (GPDH1, GPDH2 e GPDH3) e três mitocondriais (GPO1, GPO2 e GPO3) da enzima glicerol 3 fosfato desidrogenase, a presença de uma única isoforma do carreador aspartato-glutamato (SLC25A12) e a ausência do seu parálogo (SLC25A13) e a existência de

três potenciais isoformas do carreador malato-oxoglutarato (SLC25A11) e três isoformas de MDH2 diferindo inteiramente do encontrado em humanos. Ademais, suspeitamos que haja uma especificidade tecidual no tipo de mecanismo envolvido no controle do estado redox de NAD neste organismo. Neste sentido, a busca dos componentes da GPSH e MASH e da LDH no banco de dados transcriptômicos a nível tecidual gerados pelo nosso laboratório (Metabofly) revelou que em geral, os níveis de expressão dos componentes da GPSH e MASH, mas não da LDH, é regular e algumas vezes muito alta na cabeça e no tórax. Contudo, os níveis de expressão de todos os componentes das duas lançadeiras são bastante baixos no ovário, e de LDH nulo. Sendo assim, sugerimos que o principal mecanismo de controle do estado redox de NAD no ovário seja mediado pela atividade simultânea das GPSH e MASH. Além disso, no testículo os níveis de expressão de todos os componentes das duas lançadeiras são muitíssimo baixos, mas os transcritos de LDH apresentam níveis muito altos. O conjunto dos resultados apresentados indica que as lançadeiras redox mitocondriais estão presentes em *D. melanogaster* e que não há uma diversidade tecidual nos mecanismos envolvidos no controle da homeostase redox de NAD neste modelo.

Neste trabalho observamos também que há uma relevância tecido-específica na seleção do mecanismo de reciclagem de NADH citosólico. Em mamíferos, duas proteínas, uma isoforma citosólica (GPD1) e uma isoforma mitocondrial localizada na membrana interna mitocondrial (GPD2), compõem a GPSH. Por outro lado, em *D. melanogaster* encontramos seis proteínas, três isoformas citosólicas (GPDH1, GPDH2 e GPDH3) e três isoformas mitocondriais localizadas na membrana externa mitocondrial (GPO1, GPO2 e GPO3). As três isoformas citosólicas das proteínas da GPSH de *Drosophila*, retornam o mesmo ortólogo citosólico humano (GPD1) e apenas uma (GPO1) das três isoformas mitocondriais retorna o ortólogo mitocondrial humano (GPD2). Ainda tratando-se da GPSH, em relação à relevância tecido-específica, a cabeça e o tórax são tecidos em que os componentes apresentam maior expressão. Na MASH, encontramos sete proteínas em mamíferos, duas isoformas citosólicas (MDH1 e GOT1), duas isoformas mitocondriais localizadas na matriz mitocondrial (MDH2 e GOT2) e três isoformas mitocondriais (SLC25A11, SLC25A12 e SLC25A13) localizadas na membrana interna da matriz mitocondrial. Em *Drosophila*, encontramos dez proteínas, duas isoformas citosólicas (MDH1 e GOT1), quatro isoformas mitocondriais (3 isoformas de MDH2 e GOT2) e quatro isoformas mitocondriais (3 isoformas de SLC25A11 e SLC25A12) localizadas membrana interna mitocondrial. Diferente do encontrado em mamíferos, uma isoforma de SLC25A11, uma de SLC25A12 e outra de SLC25A13 a mosca da fruta, possui três isoformas de SLC25A11 e uma de SLC25A12, três isoformas de MDH2 enquanto os

mamíferos possuem apenas uma. De maneira geral, os outros componentes se apresentam muito semelhantes às isoformas encontradas em mamíferos. A relevância tecido-específica nesta lançadeira se dá prioritariamente pela cabeça e tórax também, como observamos na GPSH. Sendo assim, podemos inferir que, a maior expressão se dá nestes tecidos pois possuem maior demanda energética e reciclam NADH citosólico utilizando-se dos dois mecanismos. A expressão tecidual foi observada em quatro tecidos, cabeça, tórax, ovário e testículo. Considerando que a expressão de ovário e testículo foi relativamente baixa, consideramos outro mecanismo de reciclagem de NADH. Sabendo que para que a glicólise ocorra é necessário o fornecimento constante de NAD^+ , a enzima lactato desidrogenase (LDH) que reduz piruvato a lactato oxidando uma molécula de NADH, gerando no citosol NAD^+ e restabelecendo o equilíbrio redox da glicólise pode fazer o inverso, oxidar lactato e reduzir NAD^+ , gerando NADH. Sendo assim, fomos observar a expressão tecido-específica de LDH. A expressão de LDH no testículo é mais alta que nos outros tecidos. Com isso, sugerimos que a atividade da lactato desidrogenase é o mecanismo preferencial para aproveitamento do potencial redox no testículo enquanto o ovário possui uma expressão muito baixa dos transcritos de LDH nos permitindo inferir que este mecanismo talvez não seja tão funcional neste tecido.

As lançadeiras redox mitocondriais glicerol-fosfato e malato-aspartato e seus componentes desempenham papéis fundamentais nos diferentes estágios de *Drosophila*, por exemplo, a enzima glicerol-fosfato desidrogenase regula o metabolismo de carboidratos em larvas (LI et al., 2019), é essencial na mecânica do músculo de voo (BARNES; LAURIE-AHLBERG, 1986) e na ovogênese e embriogênese (RAI et al., 2022), a enzima glicerol-3-fosfato oxidase tem um importante papel no mecanismo de tolerância ao etanol em larvas (GEER et al., 1991; MCKECHNIE; GEER, 1986; ROSS; MCKECHNIE, 1991) e na regulação do ciclo glicerol-3-fosfato (ROSS et al., 1994). Além disso, contribuem para o aumento do consumo de oxigênio mitocondrial em situações em que os fornecedores clássicos de elétrons estejam comprometidos (CORMIER et al., 2021).

No geral, nossos resultados demonstram que os mecanismos de controle redox de NAD são essenciais para a homeostase energética e a regulação de vias metabólicas como a glicólise. Os estudos na literatura, que foram apresentados ao longo do texto, confirmam a importância que as lançadeiras redox mitocondriais glicerol-fosfato e malato-aspartato e seus componentes, destaca-se as atividades das enzimas, possuem. Além disso, dada a diversidade na arquitetura dos seus componentes, exercem papel único e diferencial na *D.melanogaster*.

BIBLIOGRAFIA

- ARCHIBALD, J. M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current biology: CB*, v. 25, n. 19, p. R911-921, 5 out. 2015.
- BARNES, P. T.; LAURIE-AHLBERG, C. C. Genetic variability of flight metabolism in *Drosophila melanogaster*. III. Effects of Gpdh allozymes and environmental temperature on power output. *Genetics*, v. 112, n. 2, p. 267–294, fev. 1986.
- BOLEY, N. et al. Navigating and mining modENCODE data. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 68, n. 1, p. 38–47, 15 jun. 2014.
- BONORA, M. et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, v. 8, n. 3, p. 343–357, set. 2012.
- 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, nov. 2020.
- BROEKS, M. H. et al. Inborn disorders of the malate aspartate shuttle. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 44, n. 4, p. 792–808, jul. 2021.
- BURKE, M. K.; ROSE, M. R. Experimental evolution with *Drosophila*. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 296, n. 6, p. R1847-1854, jun. 2009.
- CHEN, Z.-X. et al. Comparative validation of the *D. melanogaster* modENCODE transcriptome annotation. *Genome Research*, v. 24, n. 7, p. 1209–1223, jul. 2014.
- CHOLA, C. et al. Gender Identification and Classification of *Drosophila melanogaster* Flies Using Machine Learning Techniques. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2022, p. 4593330, 2022.
- CORMIER, R. J. et al. Systemic and mitochondrial effects of metabolic inflexibility induced by high fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, p. 103556, jun. 2021.
- FERNANDEZ-VIZARRA, E.; ZEVIANI, M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS letters*, v. 595, n. 8, p. 1062–1106, abr. 2021.
- FLATT, T. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 214, n. 1, p. 3–48, jan. 2020.
- GARCIA-SOUZA, L. F.; OLIVEIRA, M. F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 50, p. 156–160, maio 2014.
- GEER, B. W. et al. HERITABLE VARIATION IN ETHANOL TOLERANCE AND ITS ASSOCIATION WITH BIOCHEMICAL TRAITS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, v. 45, n. 5, p. 1107–1119, ago. 1991.
- GUO, R. et al. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical Journal*, v. 41, n. 1, p. 9–20, fev. 2018.
- JORDAN, K. W. et al. Quantitative genomics of locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biology*, v. 8, n. 8, p. R172, 2007.
- KRAUSE, S. A. et al. FlyAtlas 2 in 2022: enhancements to the *Drosophila melanogaster* expression atlas. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D1010–D1015, 7 jan. 2022.
- 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, p. dev175315, 12 set. 2019.
- LOPASCHUK, G. D. et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, v. 90, n. 1, p. 207–258, jan. 2010.
- MARTIN, W. F.; GARG, S.; ZIMORSKI, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 370, n. 1678, p. 20140330, 26 set. 2015.

MCKECHNIE, S. W.; GEER, B. W. sn-Glycerol-3-phosphate oxidase and alcohol tolerance in *Drosophila melanogaster* larvae. *Biochemical Genetics*, v. 24, n. 11–12, p. 859–872, dez. 1986.

MENAIL, H. A. et al. Flexible Thermal Sensitivity of Mitochondrial Oxygen Consumption and Substrate Oxidation in Flying Insect Species. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 897174, 2022.

NEUFER, P. D. The Bioenergetics of Exercise. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 5, p. a029678, 1 maio 2018.

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

RAI, M. et al. The *Drosophila melanogaster* enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 is required for oogenesis, embryonic development, and amino acid homeostasis. *G3 (Bethesda, Md.)*, v. 12, n. 8, p. jkac115, 29 jul. 2022.

RIGOULET, M. et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, v. 1861, n. 11, p. 148276, 1 nov. 2020.

ROBINSON, S. W. et al. FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. Database issue, p. D744-750, jan. 2013.

ROSS, J. L. et al. A model of the *Drosophila melanogaster* glycerol-3-phosphate oxidase-encoding gene. *Gene*, v. 139, n. 2, p. 219–221, 25 fev. 1994.

ROSS, J. L.; MCKECHNIE, S. W. Micro-spatial population differentiation in activity of glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) from mitochondria of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 84, n. 3, p. 145–154, 1991.

ROSSMANN, M. P. et al. Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models & Mechanisms*, v. 14, n. 6, p. dmm048912, 1 jun. 2021.

RUPRECHT, J. J.; KUNJI, E. R. S. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 45, n. 3, p. 244–258, mar. 2020.

WOLF, D. M. et al. Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *The EMBO journal*, v. 38, n. 22, p. e101056, 15 nov. 2019.

ZIMORSKI, V. et al. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*, v. 22, p. 38–48, dez. 2014.