

O FUNCIONAMENTO MITOCONDRIAL E A TEMPERATURA COMO FATOR INTERFERENTE: UMA ABORDAGEM CELULAR

Marcela Simões Teruel

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do ABC, Centro de Ciências
Naturais e Humanas, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Santo André

Abril, 2021

O FUNCIONAMENTO MITOCONDRIAL E A TEMPERATURA COMO FATOR INTERFERENTE: UMA ABORDAGEM CELULAR

Marcela Simões Teruel

Orientador: Prof. Dr. César Augusto João Ribeiro

Co-orientadores: Prof. Dr. Daniel Carneiro
Carrettiero e Prof^a. Dr^a. Maria Camila Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do ABC, Centro de Ciências
Naturais e Humanas, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Santo André

Abril, 2021

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC

Teruel, Marcela Simões

O funcionamento mitocondrial e a temperatura como fator interferente : uma abordagem celular / Marcela Simões Teruel. — 2021.

71 fls. : il.

Orientador: César Augusto João Ribeiro

Coorientador: Daniel Carneiro Carrettiero

Coorientadora: Maria Camila Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André, 2021.

1. Bioquímica. 2. Biologia Celular. 3. Fisiologia. I. Ribeiro, César Augusto João. II. Carrettiero, Daniel Carneiro. III. Almeida, Maria Camila. IV. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2021. V. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus maiores exemplos, minha mãe e meu pai, que ao longo de minha vida me apoiaram de todas as maneiras possíveis e até impossíveis;

e também ao meu companheiro de vida, Gabriel, que me serve de inspiração e me faz perceber que cada dia aqui neste tempo-espço é um presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família: meus pais, Maristela e Marcelo, meu parceiro Gabriel, meus irmãos, Nathan e Matheus, e meus avós, Vilma e Francisco, pelo zelo, intimidade e convívio maravilhosos, os quais eu não vivo sem.

Ao professor Dr. César Augusto João Ribeiro por toda paciência, cuidado e ensinamentos me dados nestes dois anos.

Aos professores Dr. Daniel Carneiro Carrettiero e Dr^a. Maria Camila Almeida, por me acolherem em um momento tão turbulento e por toda confiança posta em mim até hoje.

À Dr^a. Renata Torres da Costa, pelos incontáveis experimentos e debates científicos, mas principalmente pela companhia.

Aos meus grandes amigos Gustavo Urbani, Rafael Cerioni, Giovana Marchini, Caique Peixoto, Murilo Porto, Wellington Caio e Matheus Mendes, pela amizade que sustenta minha felicidade e pelo enorme carinho perante a tudo que produzo.

À minha melhor amiga Fernanda Lima, por ser uma das melhores constantes que tenho na vida, pelo apoio e amor irrestritos.

À Universidade Federal do ABC (UFABC) por me permitir fazer, conhecer e entender tanto e tantos.

Aos incontáveis professores que encontrei no caminho, pela formação do meu caráter e paixão.

À aleatoriedade do cosmos, por me proporcionar absolutamente tudo.

O caos é uma ordem por decifrar

José Saramago, "O Homem Duplicado"

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIACÕES.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
METODOLOGIA.....	16
1. <i>A mitocôndria e suas funções</i>	17
1.1 Aspectos Gerais.....	17
1.2 Funções mitocondriais.....	20
A RESPIRAÇÃO CELULAR.....	21
APOPTOSE.....	27
HOMEOSTASE REDOX E DETOXIFICAÇÃO.....	28
TERMOGÊNESE.....	30
1.3 Metodologias para análise do funcionamento mitocondrial.....	31
ABORDAGENS <i>IN VITRO</i>	31
ABORDAGENS <i>IN VIVO</i>	37
2. <i>A temperatura como um fator que interfere no funcionamento mitocondrial.</i> ..	39
2.1 A Temperatura.....	39
2.2 Efeitos Bioquímicos.....	40
2.3 Efeitos Mitocondriais (Celulares).....	42
ANIMAIS ECTOTÉRMICOS x ENDOTÉRMICOS.....	42
EFEITOS DIRETOS.....	44
EFEITOS INDIRETOS.....	49
2.4 Efeitos Sistêmicos.....	50
IMPACTOS CLÍNICOS.....	52
IMPACTOS ECOLÓGICOS.....	55
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE 1. Bibliografia Anotada.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da Mitocôndria	18
Figura 2. Resumo do Metabolismo Energético Mitocondrial	22
Figura 3. O Ciclo do Ácido Cítrico	23
Figura 4. A Fosforilação Oxidativa	26
Figura 5. A Termogênese Sem Tremores	31
Figura 6. Representação Esquemática dos Parâmetros Inferidos a Partir de Dados Obtidos no Respirômetro de Alta Resolução (Mitocôndrias Isoladas) . .	34
Figura 7. Representação Esquemática dos Parâmetros Inferidos a Partir de Dados Obtidos no Respirômetro de Alta Resolução (Células Intactas)	35
Figura 8. Uma Curva de Performance Térmica (TPC).	40
Figura 9. A Diferença entre um Generalista e um Especialista Térmico	57
Figura 10. Como a Temperatura Pode Agir no Funcionamento Mitocondrial e Influenciar Processos Sistêmicos.	60

LISTA DE TABELAS

Página

<u>Tabela 1.</u> Resumo de Estudos Seleccionados que Demonstram o Efeito da Temperatura nas Atividades Mitocondriais.	45
<u>Tabela 2.</u> Resumo de Alguns Efeitos da Temperatura (Hipotermia e Hipertermia) em Fenômenos Sistêmicos	52

LISTA DE ABREVIACÕES

<u>ATP</u>	Adenosina Trifosfato
<u>BAT</u>	Tecido Adiposo Marrom
<u>CI</u>	Complexo I Mitocondrial (NADH Desidrogenase)
<u>CII</u>	Complexo II Mitocondrial (Succinato Desidrogenase)
<u>CIII</u>	Complexo III Mitocondrial (Citocromo bc ₁)
<u>CIV</u>	Complexo IV Mitocondrial (Citocromo c Oxidase)
<u>CV</u>	Complexo V Mitocondrial (ATP Sintase)
<u>CAC</u>	Ciclo do Ácido Cítrico
<u>CCCP</u>	Carbonilcianeto-m-clorofenil-hidrazona
<u>cit c</u>	Citocromo c
<u>CTE</u>	Cadeia Transportadora de Elétrons
<u>DA</u>	Doença de Alzheimer
<u>DNF</u>	2,4-Dinitrofenol
<u>FAD</u>	Flavina Adenina Dinucleotídeo (oxidada)
<u>FADH₂</u>	Flavina Adenina Dinucleotídeo (reduzida)
<u>HPLC</u>	Cromatografia Líquida de Alta Performance
<u>HSP</u>	Proteína do Choque Térmico
<u>MEM</u>	Membrana Externa Mitocondrial
<u>MIM</u>	Membrana Interna Mitocondrial
<u>MRS</u>	Espectroscopia por Ressonância Magnética
<u>mtDNA</u>	DNA Mitocondrial
<u>MTE</u>	Teoria Metabólica da Ecologia (<i>Metabolic Theory of Ecology</i>)
<u>NAD⁺</u>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (oxidada)
<u>NADH</u>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (reduzida)
<u>NIRS</u>	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
<u>NMR</u>	Ressonância Magnética Nuclear
<u>OXPHOS</u>	Fosforilação Oxidativa
<u>PDC</u>	Complexo Piruvato Desidrogenase
<u>PET</u>	Tomografia por Emissão de Pósitrons

<u>Q₁₀</u>	Coeficiente de Temperatura (<i>Temperature Coefficient</i>)
<u>Q</u>	Ubiquinona (oxidada)
<u>QH₂</u>	Ubiquinol (reduzido)
<u>RCR</u>	Razão de Controle Respiratório
<u>ROS</u>	Espécies Reativas de Oxigênio
<u>ROX</u>	Consumo de Oxigênio Residual
<u>T_a</u>	Temperatura Ambiente
<u>T_c</u>	Temperatura Interna Corporal
<u>T_{crit}</u>	Temperatura Crítica
<u>TM</u>	Taxa Metabólica
<u>TPC</u>	Curva de Performance Térmica (<i>Thermal Performance Curve</i>)
<u>T_{opt}</u>	Temperatura Ótima
<u>TRP</u>	Receptor de Potencial Transitório
<u>UCP</u>	Proteína Desacopladora Mitocondrial
<u>UTD</u>	Dependência Térmica Universal (<i>Universal Temperature Dependence</i>)
<u>ΔΨ_m</u>	Potencial de Membrana Mitocondrial

RESUMO

A mitocôndria possui inegável papel na manutenção da homeostase. Além de sua função básica - mas essencial - de respiração celular, a organela também está presente nos mais diversos processos como apoptose, termogênese, balanço redox, entre outros. Atualmente, técnicas *in vitro*, como a respirometria de alta resolução, são utilizadas para avaliar o desempenho das atividades mitocondriais e, mais ainda, conferem imenso poder de interpretação. E dos muitos fatores que podem influenciar o funcionamento da mitocôndria, a temperatura tem se tornado proeminente. Coletivamente, estudos em diversas áreas apontam que a temperatura pode afetar profundamente as atividades mitocondriais. Ainda, estes efeitos a nível celular podem servir como base para explicação de fenômenos sistêmicos que a temperatura suscita, possuindo relevância para grandes tópicos, como patologia e ecologia. Então, através de uma revisão da literatura, o objetivo deste trabalho foi apresentar as formas pelas quais a temperatura impacta o funcionamento mitocondrial e como estes efeitos podem influenciar a homeostase dos organismos de maneira geral.

Palavras-chave: Metabolismo Energético, Hipotermia, Hipertermia, Teoria Metabólica da Ecologia.

ABSTRACT

The mitochondrion has an undeniable role in maintaining homeostasis. Besides its basic - but essential - function of cellular respiration, this organelle is also present in countless other processes, such as apoptosis, thermogenesis, redox balance, etc. Currently, *in vitro* methods, like high-resolution respirometry, are useful tools for evaluating mitochondrial activity. They also provide high interpretative power. And among the many factors that can impact mitochondrial activity, temperature is a prominent one. Collectively, several studies in different areas point out that temperature can utterly affect mitochondrial functioning. Moreover, these underlying cellular effects can serve as a basis for understanding the systemic phenomena that temperature evokes, being relevant for many great topics, such as pathology and ecology. Thus, by reviewing the current literature, the aim of this project was to present the ways by which temperature can impact mitochondrial functioning, and how these effects may be reflected in the whole-organism homeostasis.

Key-words: Energy Metabolism, Hypothermia, Hyperthermia, Metabolic Theory of Ecology.

INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são o principal sítio da respiração celular, na qual substratos são transformados em grandes quantidades de energia utilizando oxigênio. A respiração celular ocorre majoritariamente no interior dessa organela e tal processo é responsável pela maior parte da energia sintetizada nos organismos. De maneira geral, a mitocôndria não só executa essas atividades essenciais para a manutenção da homeostase energética, mas também é peça central nos mais diversos processos - tais como: biossíntese de compostos celulares, termogênese, apoptose, detoxificação, neurotransmissão, proliferação celular, etc - os quais são sofisticadamente regulados e indispensáveis para a vida (VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Em contrapartida, estudos acerca dos efeitos da temperatura sobre múltiplos componentes celulares vêm surgindo progressivamente nos últimos anos. Via de regra, a temperatura é um agente universal, que influencia desde os processos simples até os mais complexos (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

De maneira específica, a atuação da temperatura sobre a mitocôndria tem se mostrado bastante expressiva. A temperatura pode afetar várias etapas do funcionamento mitocondrial, como a taxa de respiração celular, a produção de calor, de radicais livres, e até mesmo os mecanismos mitocondriais envolvidos com a morte celular. Adicionalmente, condições térmicas distintas podem influenciar as atividades mitocondriais de forma desigual. Os vários efeitos provocados na mitocôndria, então, podem repercutir de maneira sistêmica, afetando o funcionamento dos organismos (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

Assim, faz-se necessário entender como a temperatura, agindo a partir de processos moleculares, pode incutir efeitos diversos, como adaptações a curto prazo ou danos a longo prazo. Inúmeras patologias apresentam desregulação mitocondrial - como disfunções genéticas, câncer e a Doença de Alzheimer, por exemplo - e uma parcela de casos pode possuir a temperatura como fenômeno

interferente, agindo tanto de forma benéfica, quanto de modo prejudicial. Ademais, em face das mudanças climáticas, temperaturas extremas potencialmente afetarão a saúde e sobrevivência dos organismos, possivelmente por meio de alterações mitocondriais (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

Sob esta perspectiva, o presente trabalho visou compreender como as variações na temperatura influenciam o funcionamento mitocondrial e, de que maneira alterações mitocondriais causadas pela temperatura podem estar relacionadas a variados tópicos complexos, como a medicina e a ecologia.

Enquanto objetivos específicos, pretendeu-se revisar os princípios do funcionamento mitocondrial, desde sua atividade básica no metabolismo energético até mecanismos mais particulares, como a apoptose, homeostase redox, detoxificação e termogênese; além de apresentar os métodos atuais *in vitro* e *in vivo* que são usuais para avaliação dessas funções. Foi proposto também explorar os amplos efeitos da temperatura na atividade mitocondrial, revelando os mecanismos pelos quais a temperatura pode afetar universalmente a homeostase dos organismos, seja de forma direta ou indireta.

Apesar de sua relevância, poucas linhas de pesquisa atualmente se encontram voltadas para este quadro. Justifica-se a presente investigação, portanto, ao considerar-se que muitos dos efeitos da temperatura a nível celular podem ser refletidos a uma escala sistêmica. Nesta perspectiva, identificar estes efeitos consiste no primeiro passo para interpretá-los.

METODOLOGIA

Esta investigação foi realizada através de uma extensa revisão da literatura. Por meio da busca em bancos de dados (Google Scholar, PubMed), seguiu-se à análise de artigos pertinentes aos tópicos "*Mitochondria*" + "*Temperature*", "*Mitochondrial Functioning*" / "*Activity*" + "*Hypothermia*" / "*Hyperthermia*", "*Metabolic Theory of Ecology*", "*Respiration*" + "*Ectotherm*" / "*Endotherm*" + "*Temperature*", entre outros.

A revisão contou com uma seleção bibliográfica (mais de 40 artigos de revisão, 70 artigos originais e alguns livros didáticos base já familiares) nestes diversos âmbitos como referência. Não houve restrição relativa ao período de publicação.

Além disso, o trabalho foi segmentado de modo que o primeiro grande tópico se concentrou em explorar a mitocôndria e suas especificidades; e num segundo capítulo, onde foram abordados os efeitos celulares e sistêmicos da temperatura.

1. A mitocôndria e suas funções

1.1 Aspectos Gerais

As descobertas acerca da mitocôndria podem ser divididas temporalmente em dois aspectos: um estrutural e outro bioquímico. No contexto estrutural, as primeiras observações de componentes celulares, que provavelmente eram mitocôndrias, datam por volta de 1840 ([Pagliarini e Rutter, 2013](#)). Foi somente depois do início do século XX, entretanto, que a bioquímica mitocondrial começou a ser desvendada.

Em 1913, Warburg auxiliou na concepção da natureza compartimentalizada da respiração celular ao descobrir as "enzimas respiratórias" mitocondriais, hoje denominadas citocromos ([Ernster e Schatz, 1981](#)). Krebs, em seu artigo de 1937 acerca do metabolismo de ácidos cetônicos ([Krebs e Johnson, 1937](#); [Pagliarini e Rutter, 2013](#)), elaborou o popular ciclo do ácido cítrico (CAC). Em 1953, dividiu o prêmio Nobel com Lipmann, o qual descobriu a coenzima A e a importância dela para o metabolismo intermediário ([The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1953](#); [Pagliarini e Rutter, 2013](#)). E, a partir de 1948, a abordagem bioquímica pôde enfim deslanchar. Lehninger e outros estudiosos comprovaram a existência da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (OXPHOS), além do fato de que as enzimas do CAC, da beta-oxidação de ácidos graxos e da OXPHOS ficam localizadas na mitocôndria ([Ernster e Schatz, 1981](#); [Pagliarini e Rutter, 2013](#)). Em 1961, Peter Mitchell formulou a teoria quimiosmótica, base da bioenergética mitocondrial ([ERNSTER & SCHATZ, 1981](#); [PAGLIARINI & RUTTER, 2013](#)).

Tantas décadas de extensa investigação levariam então à noção de que a mitocôndria seria a "usina de energia das células", por ser a maior responsável pela síntese aeróbica de combustível celular, na forma da molécula carreadora de energia universal, a *adenosina trifosfato* (ATP) ([SCHEFFLER, 2008](#)).

Neste ínterim, sempre foram largamente descritas observações acerca da similaridade estrutural entre mitocôndrias e bactérias. A saber, em 1890, Richard Altmann já teria notado que a organela possui tamanho e formato similares aos

de bactérias (**Figura 1**) ([Tzagoloff, 1982](#); [Pagliarini e Rutter, 2013](#)). Outro aspecto evidente é que mitocôndrias, analogamente às bactérias gram-positivas, são formadas por duas membranas: a Membrana Externa Mitocondrial (MEM) e a Membrana Interna Mitocondrial (MIM); as quais são banhadas por dois espaços aquosos (o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial) ([Pallen, 2011](#); [Boguszevska *et al.*, 2020](#)). Além de tudo, a maquinaria genética das mitocôndrias e das bactérias é parecida: seus DNAs são circulares e compartilham tanto semelhanças estruturais como funcionais ([PALLEN, 2011](#)).

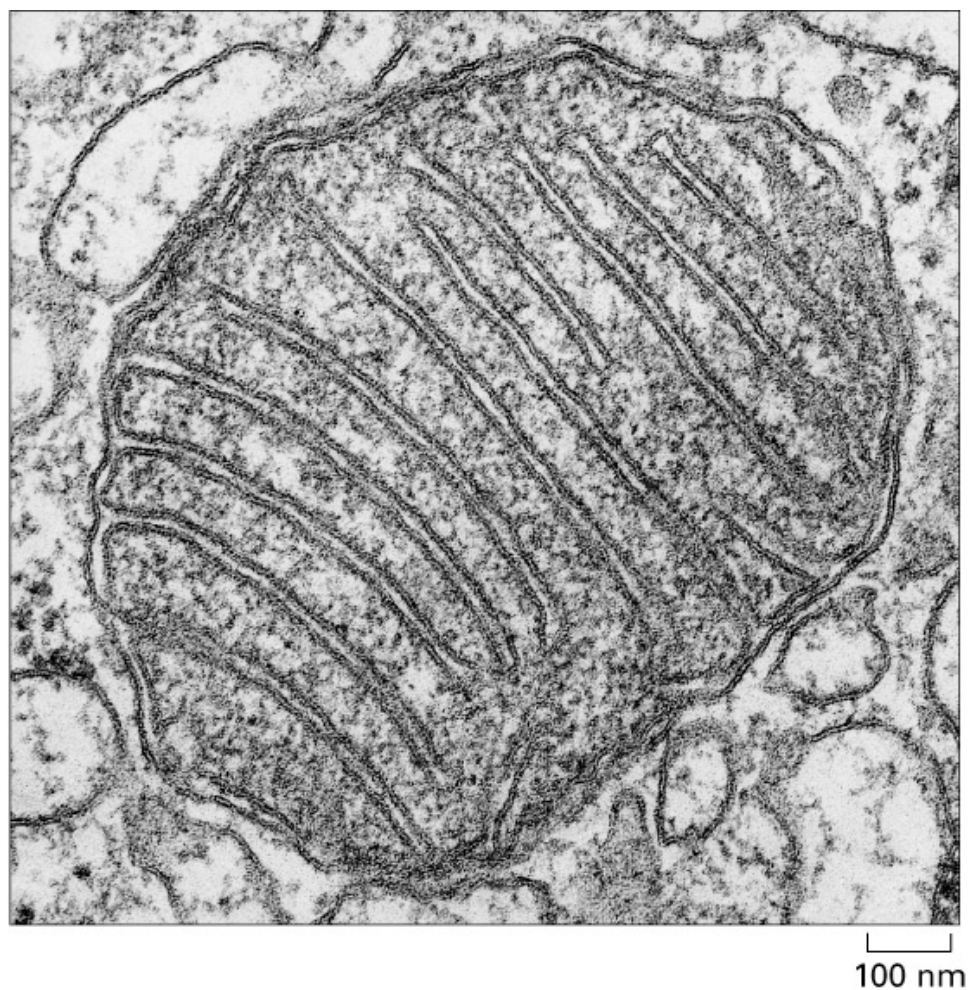


Figura 1. Estrutura da Mitocôndria. Micrografia obtida a partir de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Pode-se observar as duas membranas, matriz e espaço intermembranas. Nota-se a similaridade estrutural com uma bactéria. Fonte: [Alberts, 2010](#). Biologia Molecular da Célula, 5ª edição, fig. 14-8.

Em termos fisiológicos, a respiração celular aeróbica é outra grande similaridade: a fosforilação oxidativa desempenhada pela mitocôndria é análoga à síntese de ATP bacteriana e as duas ocorrem nas suas respectivas membranas internas (Boguszewska *et al.*, 2020). Além disso, a mitocôndria realiza o processo de fissão, o qual se assemelha à fissão binária, a divisão celular bacteriana (Boguszewska *et al.*, 2020). Mitocôndrias, portanto, são capazes de dividir de modo a controlar sua distribuição dentro da célula (Scheffler, 2008; Mishra e Chan, 2014). Apesar de ausente em bactérias, nas mitocôndrias também ocorre o processo de fusão, onde duas ou mais mitocôndrias se unem em uma maior (Pallen, 2011; Boguszewska *et al.*, 2020). Desta forma, quantidade, formato e disposição das mitocôndrias estão sob intenso controle da dinâmica de fusão e fissão mitocondrial (SCHEFFLER, 2008; MISHRA & CHAN, 2014).

E foi somente após o advento de técnicas sofisticadas de biologia molecular que se tornou possível de fato sequenciar o DNA mitocondrial (mtDNA) (Anderson *et al.*, 1981). Sua revelação fez ratificar ainda mais a teoria da endossimbiose, até aquele momento rejeitada. Hoje, ela é amplamente aceita no princípio da origem dos organismos eucariotos. De acordo com Scheffler (2008) e Archibald (2011), em 1970, a jovem bióloga Lynn Margulis reuniu evidências e formulou a seguinte teoria: em certo momento do período Pré-Cambriano, iniciou-se uma relação simbiótica entre um organismo procarionte com capacidade de realizar fosforilação oxidativa e um proto-eucarionte. O procarionte, isto é, a "proto-mitocôndria", teria invadido a célula hospedeira (de maneira análoga ao comportamento de uma bactéria invasora atual), ou até mesmo sido fagocitado (Gray, 2017). De qualquer modo, esta relação teria se tornado obrigatória, gerando assim o primeiro organismo eucarionte capaz de respiração aeróbica (SCHEFFLER, 2008; GRAY, 2017).

Se este argumento for sustentado [de que todas as células eucarióticas ou possuem, ou já possuíram e posteriormente perderam, mitocôndrias], então a posse de mitocôndrias poderá ter sido fator *sine qua non* da condição eucariótica. Isto não pode ser dito de nenhuma outra organela.

(LANE, 2007, p.13, tradução livre)

Nesta perspectiva, a mitocôndria é de fato um componente celular pivô, não apenas em seres humanos, bem como em outros organismos complexos. Até as últimas décadas, porém, a importância da mitocôndria esteve majoritariamente atrelada a sua capacidade de realizar a respiração aeróbica. O retorno de sua popularidade, por outro lado, esteve ligado ao avanço na área de proteômica mitocondrial ([Pagliarini e Rutter, 2013](#)). Estudos nesse âmbito vieram a indicar que a mitocôndria atua em muitos outros processos celulares, cruciais para a manutenção da vida. Ademais, a perturbação destes processos pode levar a uma gama de transtornos e até à morte ([PAGLIARINI & RUTTER, 2013](#)).

1.2 Funções mitocondriais

Em vista disso, faz-se necessário explorar as múltiplas funções desempenhadas pela mitocôndria. Sob um panorama geral, essa organela está envolvida não só em inúmeros processos bioquímicos básicos, tal qual a síntese de ATP; como também em atividades complexas e interligadas, como apoptose, neurotransmissão, proliferação celular e termogênese.

Um exemplo de função mitocondrial menos conhecida é a sua participação na *biossíntese* e *reciclagem* de diversos compostos como os aminoácidos, ácidos graxos, esteroides, nucleotídeos, grupo heme e até mesmo no fornecimento de intermediários para o CAC e gliconeogênese (síntese de glicose) ([SPINELLI & HAIGIS, 2018](#)).

Outro papel fundamental desempenhado pela mitocôndria é no *metabolismo de cálcio*. O cálcio age como segundo mensageiro em inúmeras atividades celulares ([Graier, Frieden e Malli, 2007](#)) e os níveis de Ca^{2+} intracelulares são regulados por mecanismos executados pela mitocôndria, em conjunto com o retículo endoplasmático e a membrana plasmática ([Devine e Kittler, 2018](#)). Mais ainda, esta função mitocondrial é especialmente relevante para a *neurotransmissão*. Isto porque, além de prover o ATP necessário para a formação e tráfego de vesículas contendo os neurotransmissores - cuja liberação é dependente de cálcio - ela maneja as concentrações de Ca^{2+} ([Devine e Kittler,](#)

2018). Assim, a regulação de Ca^{2+} por parte da mitocôndria é essencial para que haja a comunicação neuronal (DEVINE & KITTLER, 2018).

Diante da ampla atuação mitocondrial, a presente revisão destacou algumas funções mitocondriais a serem descritas com maior profundidade. São elas: a respiração celular, a apoptose, o balanço redox e a termogênese.

A RESPIRAÇÃO CELULAR

Praticamente todos os organismos utilizam a glicose como principal substrato energético (Fothergill-Gilmore e Michels, 1993). Assim, a *glicólise* é o processo de quebra da glicose (um carboidrato de seis carbonos), no qual se formam duas moléculas de *piruvato* (composto de três carbonos), gerando-se ATP no citosol (Voet e Voet, 2011; Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Este conjunto de reações não necessita da presença de oxigênio, contudo, culmina numa produção de ATP bem limitada: para cada molécula de glicose, há um ganho líquido de dois ATPs (VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Certos organismos, em situações de aerobiose, ou seja, em que há oxigênio disponível, ainda conseguem continuar o processo de oxidação. Desta forma, o piruvato e intermediários da glicólise são oxidados a CO_2 e H_2O a fim de gerar mais moléculas carreadoras de energia (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Em termos bioquímicos, este catabolismo que utiliza O_2 e gera CO_2 é o que chamamos de *respiração celular* (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Além disso, estas transformações - o CAC e a OXPHOS - são mais rentáveis, no sentido de que muito mais ATP é produzido. Ademais, ambas ocorrem essencialmente no interior da mitocôndria (**Figura 2**) (VOET & VOET, 2011).

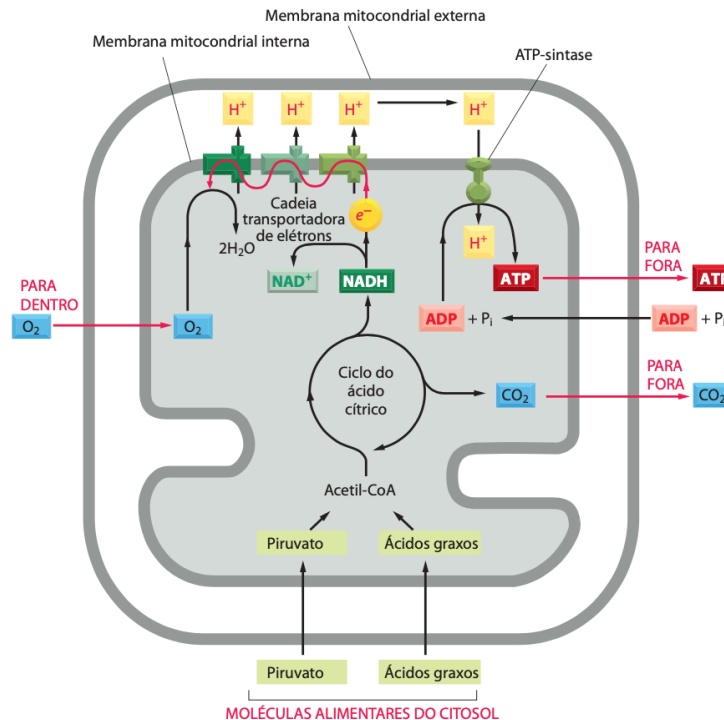


Figura 2. Resumo do Metabolismo Energético Mitocondrial. Substratos energéticos são transformados em acetil-CoA no interior da mitocôndria. Essa, por sua vez, entra no Ciclo do Ácido Cítrico (CAC). Ao final deste processo, moléculas carreadoras de energia são abastecidas e doam elétrons para uma série de complexos mitocondriais, na chamada Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE). O acoplamento desta cadeia com a produção de ATP recebe o nome de Fosforilação Oxidativa (OXPHOS). Fonte: [Alberts, 2010](#). Biologia Molecular da Célula, 5ª edição, fig. 14-10.

De forma simplificada, em organismos aeróbicos, a primeira etapa após a glicólise é a formação de *acetil-CoA*. Uma vez no interior da mitocôndria, o piruvato, produto final da glicólise, é oxidado a acetil-CoA e CO_2 e esse processo é catalisado pelo complexo enzimático *piruvato desidrogenase* (PDC) ([Voet e Voet, 2011](#); [Lehninger, Nelson e Cox, 2017](#)). A partir do piruvato, pode-se iniciar a via de respiração celular, síntese de ácidos graxos, esteróis, ou aminoácidos ([Lehninger, Nelson e Cox, 2017](#)). Para tanto, ele precisa ser transportado para a mitocôndria através de um transportador específico, pois a MIM é extremamente seletiva e impermeável a substâncias carregadas ([Gray, Tompkins e Taylor, 2013](#)). Isto ocorre a fim de manter um gradiente eletroquímico no espaço intermembranar - essencial para a OXPHOS ([GRAY, TOMPKINS & TAYLOR, 2013](#)).

Assim, a acetil-CoA é a molécula que irá abastecer o CAC. Ele consiste numa sequência de reações que, de forma cíclica, permitem oxidar a acetil-CoA em duas moléculas de dióxido de carbono, fornecendo um fosfato de alta energia e quatro moléculas carreadoras reduzidas (**Figura 3**) (Voet e Voet, 2011; Lehninger, Nelson e Cox, 2017). O CAC funciona como um grande centro anaplerótico, onde anabolismo e catabolismo operam de maneira refinada em associação com inúmeras outras vias (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

A acetil-CoA entra no CAC e passa por oito reações de rearranjo e oxidação. A cada ciclo, apenas uma molécula de ATP é gerada (fosforilação a nível de substrato pela succinil-CoA sintetase). Contudo, quatro das oito reações do ciclo irão reduzir os cofatores doadores de elétrons: o NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e o FAD (flavina-adenina dinucleótido) (Voet e Voet, 2011). Essas moléculas, uma vez reduzidas, serão utilizadas como doadores de elétrons na *cadeia transportadora de elétrons* (a CTE) que, finalmente, levará à geração de uma grande quantidade de ATP (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

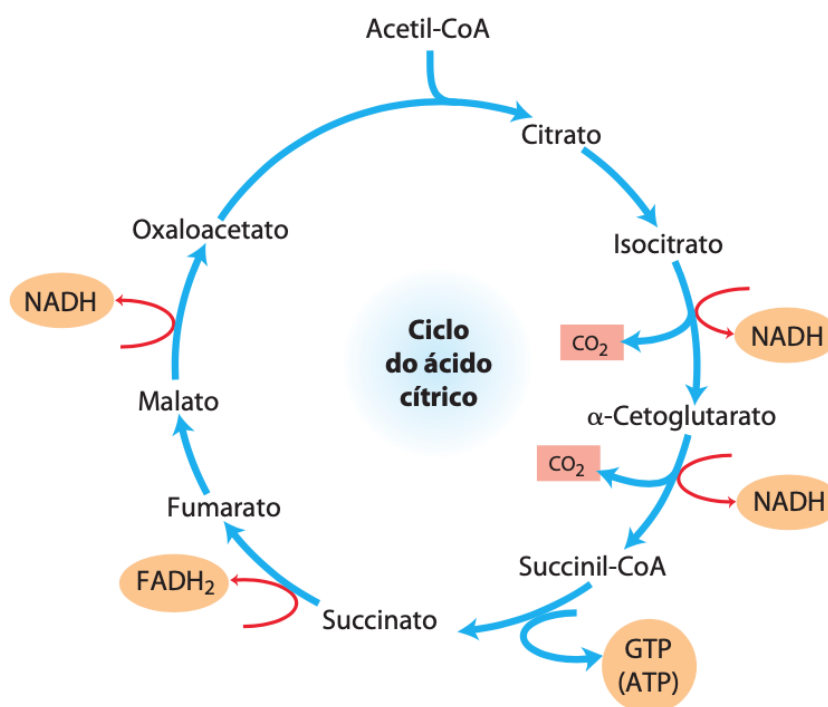


Figura 3. O Ciclo do Ácido Cítrico. As reações estão indicadas pelas setas azuis. Os produtos e intermediários obtidos em uma volta do CAC estão em preto e laranja (círculos). Fonte: Lehninger, Nelson e Cox, 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª edição, fig. 16-14.

A OXPHOS é a última etapa da respiração celular (**Figura 4**). Nela, o oxigênio atua comoceptor final de elétrons, e forma-se água. Estes elétrons advêm das moléculas de NADH e FADH₂, provenientes das oxidações ocorridas no CAC (Voet e Voet, 2011; Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Neste processo, o fluxo de elétrons gera um gradiente eletroquímico entre as membranas mitocondriais; o gradiente então, irá permitir o acoplamento da CTE à síntese de ATP (VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Para compreender como a OXPHOS culmina na síntese de ATP, é preciso considerar a *teoria quimiosmótica*. Essa teoria foi formalmente proposta por Peter Mitchell em 1961 (Rich, 2008; Pagliarini e Rutter, 2013), mas muito mais se esclareceu após novas evidências acerca da estrutura de proteínas da CTE, como a ATP sintase e complexos I e IV (MORELLI *et al.*, 2019).

De acordo com Morelli *et al.* (2019), a teoria quimiosmótica original parte de 3 pressupostos básicos. O primeiro afirma que "há uma *cadeia transportadora de elétrons*, a qual provê a transferência de energia em forma de H⁺ de um lado da membrana para outro", sendo que o gradiente se dá de modo que os prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. O segundo prevê a existência da *ATP sintase*, complexo o qual "sintetiza e hidrolisa ATP ao translocar estes prótons". Por fim, é necessário que a MIM seja "*impermeável* a espécies iônicas, incluindo-se os prótons", de maneira que eles possam ser bombeados somente através dos complexos mitocondriais embebidos nesta membrana (MORELLI *et al.*, 2019).

Em vista disso, o primeiro passo para a OXPHOS é a CTE. Nela, os elétrons dos cofatores reduzidos (NADH e FADH₂) são transferidos para uma série de carreadores de elétrons ou "centros redox", os quais, em sua maioria, são complexos proteicos integrais da MIM (Voet e Voet, 2011; Lehninger, Nelson e Cox, 2017). De forma geral, a transferência de elétrons se dá a partir de moléculas doadoras de elétrons para diversas proteínas com capacidade redutora - a "ubiquinona (Q), os citocromos (cit), proteínas Fe-S e, finalmente, para o O₂" (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Logo, é de se esperar que os potenciais de redução dos componentes da cadeia encontrem-se em ordem crescente (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Deste modo, os elétrons fluem livremente de

regiões com menor potencial redutor para regiões de maior potencial redutor (VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Os elétrons são transferidos por entre complexos proteicos supramoleculares embebidos na MIM (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). O *Complexo I* mitocondrial (CI), também chamado de NADH Desidrogenase, catalisa duas reações que irão culminar na transferência de um H^+ mais o íon hidreto do NADH para a Q, e também no bombeamento de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranas. Assim, os produtos são o ubiquinol (QH_2) e o NAD^+ (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

O *Complexo II* (CII) é a Succinato Desidrogenase, a única proteína do CAC que está fixa na membrana (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Este complexo catalisa a oxidação do succinato e a redução da Q. A transferência se dá da seguinte maneira: do succinato para o FAD, dele para os centros Fe-S e por fim para a Q. Os CI e CII, então, atuam paralelamente a fim de transferir elétrons para a ubiquinona a partir de doadores diferentes (NADH ou $FADH_2$) (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Em contrapartida, o *Complexo III* (CIII - Complexo citocromo bc_1) catalisa a transferência de elétrons das moléculas de ubiquinol obtidas para outra proteína, o citocromo c (cit c) (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). O cit c, contudo, não se encontra no interior do complexo, pois se movimenta livremente entre o CIII e CIV no espaço intermembranas. Além disso, o CIII acopla a transferência de elétrons com o bombeamento de mais prótons para o espaço intermembranas (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

O *Complexo IV* (CIV - Citocromo c Oxidase), no último passo da CTE, catalisa a transferência de elétrons para oceptor final de elétrons, o O_2 (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Desta forma, o oxigênio é reduzido com os elétrons provenientes do cit c, culminando na formação de H_2O . Nesse processo, dois prótons são consumidos e dois são bombeados para o espaço intermembranas (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

O último passo da respiração celular, a OXPHOS propriamente dita, é o acoplamento da transferência de elétrons à fosforilação oxidativa. Segundo a teoria quimiosmótica, o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas

resulta num gradiente *eletroquímico* ($\Delta\Psi_m$) (**Figura 4**). Elétrico ($\Delta\Psi$), pois a matriz mitocondrial se encontra mais negativa do que o espaço intermembranas (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). E químico (ΔpH), porque a matriz é mais alcalina do que o espaço intermembranas (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). A soma destes dois componentes gera o gradiente $\Delta\Psi_m$, o qual chamamos de força próton-motriz da síntese de ATP, ou *potencial de membrana mitocondrial* (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

O $\Delta\Psi_m$ é mantido fisiologicamente a níveis relativamente constantes (Zorova *et al.*, 2018). Apesar de variações pequenas serem comuns, alterações prolongadas no $\Delta\Psi_m$, como o seu aumento (*hiperpolarização*) ou decréscimo (*despolarização*), podem ocasionar danos celulares irreversíveis (ZOROVA *et al.*, 2018).

Finalmente, o *Complexo V* (CV - ATP sintase) possui um poro específico, por onde estes prótons podem retornar passivamente (Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Isto permite, enfim, acoplar o retorno à síntese de ATP a partir de ADP (Adenosina Difosfato) + Pi (Fosfato Inorgânico), um processo essencialmente endergônico (VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

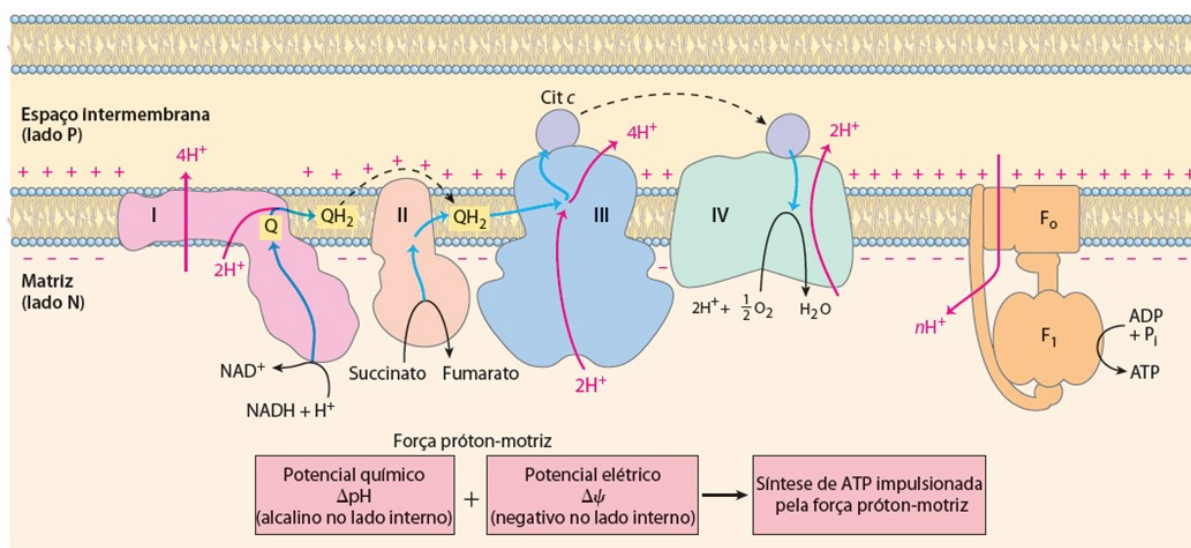


Figura 4. A Fosforilação Oxidativa. Os complexos mitocondriais (coloridos) estão embebidos na membrana interna mitocondrial (MIM). Os elétrons são transportados por eles ao mesmo tempo que os prótons são bombeados para fora. A força próton-motriz ($\Delta\Psi_m$) gerada é capaz de fornecer energia para a síntese de ATP. Fonte: Lehninger, Nelson e Cox, 2014. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª edição, fig. 19-19.

Vale ressaltar que, na presença de compostos ou estruturas que aumentem a permeabilidade iônica da MIM, o gradiente eletroquímico é dissipado - pois os prótons são capazes de retornar sem o acoplamento à síntese de ATP (Voet e Voet, 2011). Este processo de desacoplamento libera energia em forma de calor, a chamada *termogênese* mitocondrial, que será explorada adiante (VOET & VOET, 2011).

Além de tudo, alguns tecidos são capazes de quebrar não só a glicose mas também ácidos graxos a fim de obter energia. Este processo, a *β-oxidação de ácidos graxos*, é mitocondrial, podendo ocorrer também nos peroxissomos (Koolman e Röhm, 2004; Lehninger, Nelson e Cox, 2017). Como consequência, moléculas de acetil-CoA são retiradas do ácido graxo ciclicamente e depois sofrem oxidação no CAC. Finalmente, os elétrons obtidos a partir da *β-oxidação* são utilizados na CTE para sintetizar ATP (KOOLMAN & RÖHM, 2004; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

APOPTOSE

A função mitocondrial de respiração celular foi uma das primeiras a serem descobertas e a mais explorada durante muitas décadas. Todavia, com o desenvolvimento da proteômica, muitas outras funções foram identificadas. Um dos primeiros estudos a elucidar os papéis paralelos da mitocôndria dizia respeito ao seu envolvimento na morte celular programada, ou *apoptose* (KIBERSTIS, 1999; PAGLIARINI & RUTTER, 2013).

Pesquisadores como Green e Reed (1998) ajudaram a esclarecer como a mitocôndria também possui papel central no processo de apoptose, pelo menos em grande parte dos organismos. De modo geral, a mitocôndria participa da apoptose por três mecanismos: pela interrupção da CTE; pelo aumento da produção das *espécies reativas de oxigênio* (ROS) ou ao liberar proteínas mitocondriais no citosol da célula que são capazes de ativar a cascata de apoptose (Green e Reed, 1998). É importante realçar que os dois primeiros mecanismos são característicos da fase final, ou *late apoptosis*, de modo que a principal forma que a mitocôndria

possui para iniciar eventos apoptóticos é a *liberação do citocromo c* para o citosol (GREEN & REED, 1998; PAGLIARINI & RUTTER, 2013).

O cit *c*, portanto, é a principal proteína mitocondrial capaz de ativar e reagir com proteases citosólicas, as chamadas caspases (Green e Reed, 1998). As caspases são as efetoras do processo de morte celular programada (Green e Reed, 1998). De maneira simplificada, o cit *c* liberado no citosol irá fazer parte do "apoptossomo" que, por sua vez, ativará a caspase-9, dando início à cascata apoptótica (GREEN & REED, 1998).

HOMEOSTASE REDOX E DETOXIFICAÇÃO

Para manter a homeostase redox, a célula necessita de mecanismos que equilibrem a produção e a detoxificação de substâncias reativas. A mitocôndria é a maior responsável por estes dois processos. Em vista disso, ela é um dos principais sítios para a manutenção do balanço redox (GEORGIEVA *et al.*, 2017).

Os produtos secundários do metabolismo energético mitocondrial podem possuir funções celulares, mas também podem ser tóxicos (Spinelli e Haigis, 2018). Desta forma, a mitocôndria é equipada com mecanismos para lidar com estes compostos. Um exemplo é a amônia. Ela resulta do metabolismo de aminoácidos, nucleotídeos e também da microbiota; contudo, precisa ser eliminada, uma vez que é tóxica para alguns animais (Spinelli e Haigis, 2018). Por isso, na mitocôndria hepática, acontecem algumas reações do ciclo da ureia, no qual a amônia é metabolizada em ureia, e esta pode finalmente ser excretada (SPINELLI & HAIGIS, 2018).

Há também a questão das ROS. Dentre as ROS mais relevantes, a maior parte é derivada do superóxido (O_2^-) (Sena e Chandel, 2012). Elas são primariamente produzidas a partir do escape de elétrons dos componentes da CTE mitocondrial para o oxigênio molecular (Handy e Loscalzo, 2012; Spinelli e Haigis, 2018). Mais ainda, estudos mostram que as ROS podem possuir um papel dual na fisiologia celular (SENA & CHANDEL, 2012).

Em níveis baixos, as ROS são essenciais para uma célula animal normal, tendo papel vital em processos, tais como a ativação de células imunes, migração e diferenciação celular (Sena e Chandel, 2012; Spinelli e Haigis, 2018). Em concentrações um pouco maiores, as ROS são indispensáveis na sinalização e adaptação ao estresse - situações como hipóxia, mudanças no $\Delta\Psi_m$, disponibilidade de substratos, entre outros (Sena e Chandel, 2012; Spinelli e Haigis, 2018). Além disso, nessas concentrações não tão altas, somadas a um aumento no $\Delta\Psi_m$, pressupõe-se que a mitocôndria também atua promovendo a *proliferação celular* (RUSTIN, 2002; ARCIUCH *et al.*, 2012; SPINELLI & HAIGIS, 2018).

No entanto, altos níveis de ROS podem nitidamente induzir dano celular. Dentre eles, as ROS podem danificar as estruturas de lipídios, proteínas e DNA (Sena e Chandel, 2012; Schieber e Chandel, 2014). A homeostase redox da célula, então, depende de mecanismos enzimáticos eficientes para detoxificar as ROS (SPINELLI & HAIGIS, 2018).

Acredita-se, assim, que disfunções nos mecanismos redox mitocondriais possam levar à apoptose, uma vez que mitocôndrias com funcionamento prejudicado comprometem fortemente o desempenho celular. De acordo com a revisão realizada por Rustin (2002), a morte celular por apoptose pode ser induzida quando o aumento no $\Delta\Psi_m$ vem atrelado de uma exacerbação dos níveis de produção de ROS até um ponto irreversível (RUSTIN, 2002).

Por fim, células proliferativas com caráter tumoral apresentam um grau de produção de ROS muito mais próximo ao danoso, além de uma diminuição na OXPHOS (Rustin, 2002; Arciuch *et al.*, 2012). Em contrapartida, o metabolismo glicolítico nestas células é mais acentuado. Isto ocorre, possivelmente, pela maior necessidade de aquisição facilitada de nutrientes, do que de uma alta produção de ATP, como na maioria das células (Vander-Heiden, Cantley e Thompson, 2009). Este efeito incomum de dependência glicolítica é chamado de *efeito Warburg* (Vander-Heiden, Cantley e Thompson, 2009; Arciuch *et al.*, 2012) e, em um contexto clínico, pode ser um importante marcador de células tumorais. Ainda, evidências apontam que a inibição mitocondrial pode ser uma estratégia terapêutica eficaz contra o câncer (AHN & METALLO, 2015).

TERMOGÊNESE

Certos agentes são capazes de desacoplar a oxidação da fosforilação na CTE mitocondrial e por isso, são chamados de *desacopladores* mitocondriais (Koolman & Röhm, 2004). Dentre eles estão moléculas exógenas como o DNF (2,4-dinitrofenol) e o CCCP (carbonilcianeto-m-clorofenil-hidrazona) (Voet e Voet, 2011; Evinova *et al.*, 2020). Além disso, as mitocôndrias de tecidos específicos são equipadas naturalmente com as chamadas *proteínas desacopladoras mitocondriais* (UCP) (KOOLMAN & RÖHM, 2004; VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

As UCPs são canais iônicos (Koolman & Röhm, 2004) que se localizam na MIM (Voet e Voet, 2011). Sua função é permitir que os prótons bombeados pela CTE para o espaço intermembranas retornem para a matriz sem passar pela ATP sintase (Koolman & Röhm, 2004; Voet e Voet, 2011). Desta forma, a energia proveniente da oxidação é dissipada, não para produzir ATP, e sim liberada em forma de calor (**Figura 5**) (KOOLMAN & RÖHM, 2004; VOET & VOET, 2011; LEHNINGER, NELSON & COX, 2017).

Este processo, chamado de *termogênese sem tremores*, é realizado pela UCP1, localizada nas mitocôndrias do *tecido adiposo marrom* (BAT) (Voet e Voet, 2011). De modo geral, este fenômeno é especialmente valioso para mamíferos pequenos e recém nascidos (pois sua razão entre área de superfície e volume é baixa, o que faz com que eles percam calor com maior facilidade), e também animais que hibernam (LEHNINGER, NELSON & COX, 2017; LEE *et al.*, 2019).

Contudo, estudos notaram a presença de outras UCPs em outros tecidos (Koolman & Röhm, 2004; Voet e Voet, 2011). A UCP2 pode ser encontrada também no tecido adiposo branco e a UCP3 encontra-se até em músculos (Voet e Voet, 2011). Assim, estes achados são particularmente importantes para estudos do metabolismo. Ativadas por sinais hormonais como a tiroxina, essas UCPs podem aumentar a taxa metabólica (TM) basal (Koolman & Röhm, 2004), atuando como fatores regulatórios do metabolismo.

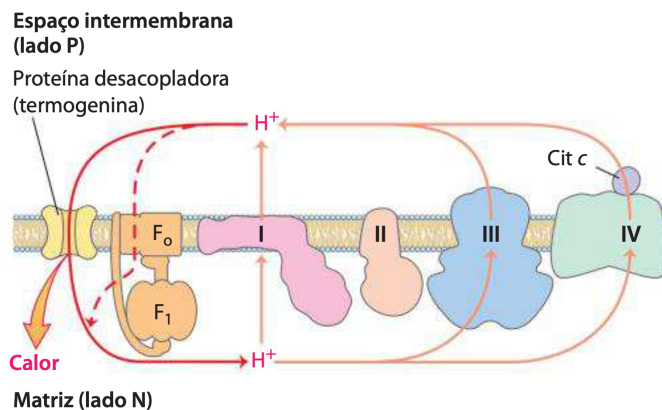


Figura 5. A Termogênese Sem Tremores. Proteínas desacopladoras podem permitir o retorno dos prótons do espaço intermembranas, desacoplando a CTE à síntese de ATP, de maneira a dissipar sua energia na forma de calor. Fonte: [Lehninger, Nelson e Cox, 2014](#). Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª edição, fig. 19-36.

1.3 Metodologias para análise do funcionamento mitocondrial

Em virtude desta gama de funções mitocondriais, torna-se indispensável entender como a organela normalmente se comporta. Logo, uma série de metodologias podem ser empregadas para medir o funcionamento mitocondrial e entender até que ponto ele pode ser comprometido sob condições atípicas. As abordagens são amplas, e incluem pesquisas *in vitro* (mitocôndrias isoladas, células permeabilizadas e células intactas) e *in vivo* (tecidos e organismos vivos).

ABORDAGENS *IN VITRO*

Nos últimos anos, técnicas *in vitro* têm se consolidado como poderosas ferramentas para avaliação do funcionamento mitocondrial. Sua vantagem é que, além de possuírem baixo custo e serem de fácil manipulação, elas também trazem uma interpretação mecanicista dos fenômenos que afetam a mitocôndria ([Lanza e Nair, 2010](#)). Como ponto negativo, elas não abordam todo o contexto que modelos *in vivo* propõem ([Perry et al., 2013](#)). Além disso, o funcionamento mitocondrial possui heterogeneidade entre os tecidos e células ([Kuznetsov e Margreiter, 2009](#)).

Portanto, a escolha de modelos *in vitro* deve atender aos requisitos da investigação e estar atrelada à noção de que há certas limitações fisiológicas.

Os métodos *in vitro* geralmente abrangem o uso de mitocôndrias isoladas, de células inteiras permeabilizadas ou de células intactas provenientes de culturas (imortalizadas ou primárias) (PERRY *et al.*, 2013).

As mitocôndrias isoladas podem ser obtidas através de centrifugação diferencial a partir de tecidos ou células (Perry *et al.*, 2013). A vantagem de usá-las reside na facilidade de estudar os mecanismos bioenergéticos e integridade mitocondrial sem influência de componentes celulares (Kuznetsov *et al.*, 2008; Brand e Nicholls, 2011). Mas, como consequência, essa técnica pode afetar a estrutura mitocondrial; uma grande quantidade de células e tecidos deve ser usada; e o contexto de interações celulares normais entre mitocôndria e citosol é omitido (KUZNETSOV *et al.*, 2008; PERRY *et al.*, 2013).

A técnica de permeabilização de células traz uma alternativa a algumas dessas desvantagens. Com adição de agentes químicos - saponinas - a membrana plasmática perde sua integridade, o que permite uma interação entre o ambiente intracelular e o meio de incubação (Kuznetsov *et al.*, 2008), culminando no acesso de substratos à mitocôndria (Perry *et al.*, 2013). Com esta técnica, também é possível investigar a integridade da MEM. Se houver dano à MEM, o cit c é liberado, depletado e, portanto, a CTE é inibida. A adição de mais cit c, então, faz com que a respiração seja estimulada novamente (KUZNETSOV *et al.*, 2008; PERRY *et al.*, 2013).

Por fim, a utilização de células intactas possui maior relevância fisiológica (Brand e Nicholls, 2011), uma vez que se aproxima mais das condições encontradas *in vivo*. Apesar disso, o cultivo destas células é muito mais complexo (Brand e Nicholls, 2011); algumas linhagens imortalizadas possuem maior metabolismo anaeróbio (glicolítico) (Perry *et al.*, 2013); e a membrana plasmática íntegra dificulta a absorção de substratos de interesse (BRAND & NICHOLLS, 2011).

Neste cenário, as técnicas *in vitro* mais relevantes consistem na *análise da respiração mitocondrial*. Elas, em geral, se utilizam de eletrodos do tipo Clarke (Perry *et al.*, 2013), os quais permitem detectar a variação do fluxo de oxigênio em

determinado meio. Assim, assume-se que as mudanças na concentração de O_2 ocorrem devido à atividade biológica de respiração celular das células (Chance e Williams, 1955; Perry *et al.*, 2013). Ou seja, a diminuição na concentração de oxigênio observada com o passar do tempo é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio por parte da mitocôndria (Chance e Williams, 1955; Perry *et al.*, 2013). Atualmente, a técnica mais precisa para mensurar esse consumo de oxigênio é a *respirometria de alta resolução* (ex: *OROBOROS instruments*) (PERRY *et al.*, 2013).

Segundo Chance e Williams (1955), os experimentos de respirometria com mitocôndrias isoladas possuem estados definidos (**Figura 6**), após titulação com diversos substratos. Deste modo, o *Estado 1* ocorre após a adição das mitocôndrias ao meio de ensaio, sem adição de substratos ou ADP. O consumo de O_2 aqui é quase nulo. O *Estado 2*, por sua vez, se inicia com a adição de substratos energéticos, que são oxidados e há a formação do $\Delta\Psi_m$, o que ligeiramente aumenta o consumo de O_2 . Já o *Estado 3* vem após adicionar-se também ADP, possibilitando o acoplamento da respiração (OXPHOS) e um alto consumo de O_2 . Por fim, o *Estado 4* reflete a taxa de respiração após depleção do ADP adicionado (transformado em ATP). Esta fase também é chamada de *Leak*, uma vez que representa o vazamento de prótons - componente não fosforilativo relacionado à geração de calor (CHANCE & WILLIAMS, 1955; PERRY *et al.*, 2013; BIOBLAST, 2021).

Ademais, o termo *razão de controle respiratório* (RCR) equivale ao quociente [Estado 3/Estado 4], e é utilizado como índice do acoplamento mitocondrial (entre consumo de O_2 e síntese de ATP) (CHANCE & WILLIAMS, 1955; PERRY *et al.*, 2013).

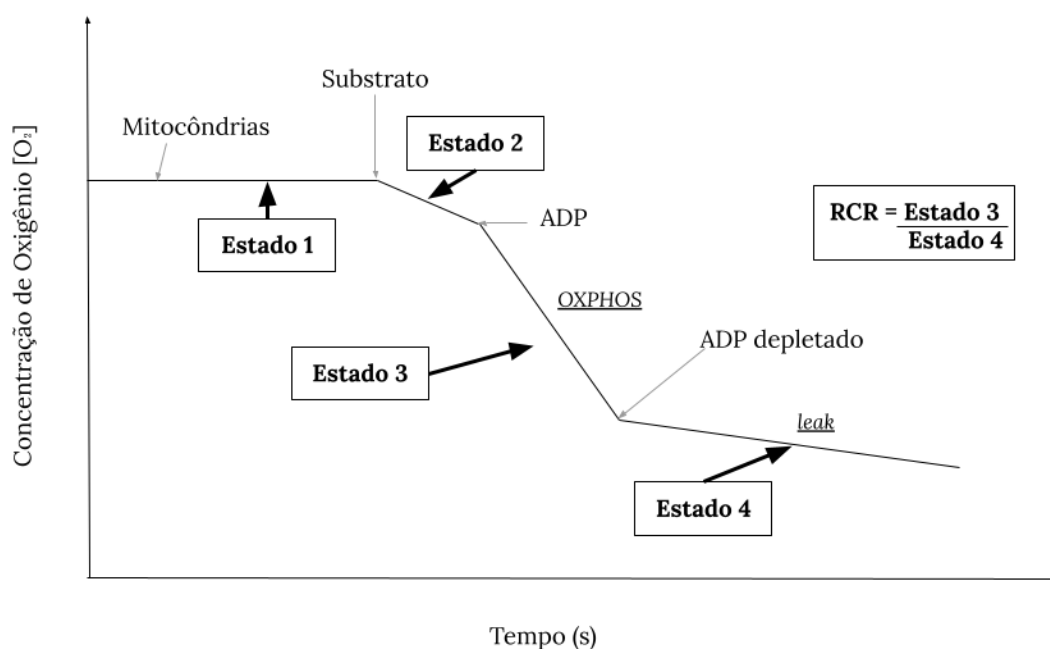


Figura 6. Representação Esquemática dos Parâmetros Inferidos a Partir de Dados Obtidos no Respirômetro de Alta Resolução (Mitocôndrias Isoladas). RCR: Razão de Controle Respiratório.

Com relação a células intactas, os parâmetros obtidos na respirometria são levemente diferentes (**Figura 7**). Em virtude da integridade plasmática, substratos e ADP não penetram as células; entretanto, inibidores e desacopladores mitocondriais podem atravessar e permitir a parametrização de estados respiratórios (HUTTER *et al.*, 2006).

O primeiro estado, chamado *ROUTINE*, reflete a respiração basal após adição das células ao equipamento. Depois desta medida, geralmente adiciona-se um inibidor do CV (ex: oligomicina). Este irá produzir um estado similar ao Estado 4 em mitocôndrias isoladas: onde a *Respiração Acoplada à Síntese de ATP* (ATP) é eliminada, restando o *Vazamento de Prótons (LEAK)* e *Consumo de Oxigênio Residual Não-Mitocondrial (ROX)* (HUTTER *et al.*, 2006; EVINOVA *et al.*, 2020).

Depois, a adição de desacopladores mitocondriais (ex: CCCP) induz o estado de respiração *MAXIMAL*, um processo não fisiológico onde a CTE está desacoplada à síntese de ATP - operando, assim, a nível máximo do fluxo de elétrons, com intenso consumo de oxigênio. Quando se subtrai a respiração basal

(*Routine*) deste parâmetro (*Maximal*), é possível obter a *Capacidade de Reserva Respiratória (SPARE)*. Esta, portanto, reflete o quanto o consumo de O_2 mitocondrial pode ser incrementado em resposta a diversos estímulos (HUTTER *et al.*, 2006; EVINOVA *et al.*, 2020).

A RCR, por sua vez, pode ser obtida na razão entre respiração máxima e respiração após adição de oligomicina (HUTTER *et al.*, 2006; EVINOVA *et al.*, 2020).

Por fim, para inferir a *ROX*, ao final da corrida adiciona-se inibidores do restante da CTE, como a rotenona (inibidor CI) e a antimicina-A (inibidor CIII). A *ROX* reflete o consumo de O_2 utilizado por outros mecanismos enzimáticos não mitocondriais, como o das oxidases (HUTTER *et al.*, 2006; EVINOVA *et al.*, 2020).

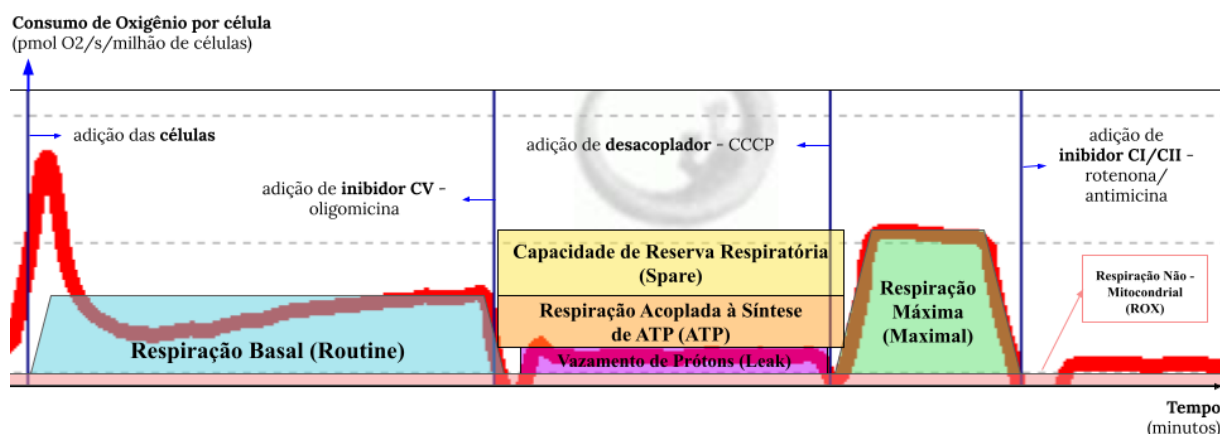


Figura 7. Representação Esquemática dos Parâmetros Inferidos a Partir de Dados Obtidos no Respirômetro de Alta Resolução (Células Intactas). *Routine*: Respiração Basal. *ATP*: Respiração Acoplada à Síntese de ATP. *Leak*: Vazamento de Prótons. *Maximal*: Respiração Máxima. *Spare*: Capacidade de Reserva Respiratória. *ROX*: Consumo de Oxigênio Residual Não-Mitocondrial.

Adicionalmente, outras técnicas *in vitro* utilizadas se baseiam em:

➤ *Avaliação da eficiência do acoplamento mitocondrial.* Este parâmetro também pode ser obtido através da razão P/O. Ela equivale ao número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigênio reduzido na CTE (Hinkle, 2005). Apesar de existir um debate acerca dos valores normais para P/O (Salin *et al.*, 2015), esta função (que pode ser obtida por meio da respirometria) é utilizada

para inferir acerca da eficiência do acoplamento da CTE à produção de ATP (HINKLE, 2005; SALIN *et al.*, 2015).

➤ *Avaliação da produção de ROS mitocondrial.* Utilizando-se sondas fluorescentes para espécies reativas diferentes (MitoSOX Red - O_2^- ; Peroxy Green - H_2O_2) é possível observá-las nas células sob microscopia (DEDKOVA & BLATTER, 2012; PERRY *et al.*, 2013);

➤ *Mensuração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).* Medidas qualitativas do $\Delta\Psi_m$ podem ser obtidas através de microscopia e citometria de fluxo utilizando corantes como a rodamina 123 (Rho123) (Dedkova e Blatter, 2012; Perry *et al.*, 2013). Métodos eletrofisiológicos - usualmente realizados em mitocôndrias isoladas - permitem obter medidas quantitativas do $\Delta\Psi_m$, ao utilizar eletrodos sensíveis a sondas catiônicas (BRAND & NICHOLLS, 2011; PERRY *et al.*, 2013);

➤ *Mensuração da concentração de substâncias mitocondriais (ATP, Ca^{2+} e Na^+).* A reação do ATP com a luciferina possibilita a detecção da produção de ATP da amostra utilizando um luminômetro (Lanza e Nair, 2010). O conteúdo de ATP também pode ser avaliado pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Jeger *et al.*, 2013). As concentrações de Ca^{2+} e Na^+ mitocondriais, intimamente relacionadas, podem ser medidas a partir de sondas fluorescentes (DEDKOVA & BLATTER, 2012; PERRY *et al.*, 2013; GLANCY, 2020);

➤ *Determinação do ATP glicolítico e mitocondrial.* Este método consiste numa utilização simples do efeito Pasteur (Merlo-Pich *et al.*, 2004). O efeito Pasteur ocorre em algumas células quando um decréscimo na OXPHOS induz compensação glicolítica, ou seja, o nível de ATP é mantido por um aumento na glicólise (Merlo-Pich *et al.*, 2004). Este aumento pode ser refletido nos níveis de lactato, que aumentam proporcionalmente (Merlo-Pich *et al.*, 2004). Desta forma, pode-se distinguir o ATP glicolítico do mitocondrial pela diferença na produção de lactato (MERLO-PICH *et al.*, 2004).

➤ *Avaliação de enzimas e complexos mitocondriais.* A expressão, atividade e concentração de enzimas do CAC, proteínas da CTE (como CI e CIV) e substratos

específicos podem ser facilmente avaliadas com técnicas imunológicas ou com *kits* comerciais (BRAND & NICHOLLS, 2011; GLANCY, 2020);

➤ *Observação da morfologia mitocondrial.* Forma, estrutura e dinâmica (fissão, fusão, interação com outras organelas) da mitocôndria podem ser analisadas sob microscopia de luz ou eletrônica; esta, porém, impossibilita observar células vivas, dado que o feixe de elétrons as destrói (DEDKOVA & BLATTER, 2012; GLANCY, 2020).

ABORDAGENS *IN VIVO*

As metodologias de avaliação do funcionamento mitocondrial *in vivo* têm avançado consideravelmente (Lanza e Nair, 2010). Elas permitem investigar de maneira não invasiva e segura a capacidade mitocondrial, de modo relevante para a fisiologia (Lanza e Nair, 2010). Contudo, vale salientar que este ganho de especificidade é equilibrado com uma perda na interpretatividade dos resultados (BRAND & NICHOLLS, 2011).

Sendo assim, as técnicas *in vivo* atualmente em voga são:

➤ *Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS)* - também chamada de Ressonância Magnética Nuclear (NMR). A MRS de fósforo (³¹P-MRS) é capaz de monitorar os níveis de fosfatos energéticos, como o ATP e a fosfocreatina muscular (Lanza e Nair, 2010; Brand e Nicholls, 2011; Perry *et al.*, 2013). Desta maneira, a ³¹P-MRS é utilizada para avaliar a capacidade oxidativa e taxas basais de síntese de ATP em tecidos vivos e organismos inteiros (Perry *et al.*, 2013). Já a MRS de carbono (¹³C-MRS), avalia a eficiência bioenergética da mitocôndria ao identificar a razão entre o consumo de componentes carbônicos no CAC e a síntese de ATP (LANZA & NAIR, 2010; PERRY *et al.*, 2013).

➤ *Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS).* Esta técnica permite detectar a oxigenação tecidual a partir da medição dos níveis de grupos oxi e desoxi-heme (Lanza e Nair, 2010). A NIRS, portanto, ajuda a determinar as taxas de consumo de O₂ teciduais, sendo especialmente relevante para estudos com músculo esquelético (LANZA & NAIR, 2010).

➤ *Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET)*. A PET permite medir os níveis de captação da glicose no organismo o que, em grande parte, pode refletir a OXPHOS mitocondrial (Brand e Nicholls, 2011). No entanto, como mencionado, essa interpretação não pode ser feita de maneira direta.

➤ *Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica*. Esta é a técnica mais direta para detectar radicais livres *in vivo* (Perry *et al.*, 2013). Contudo, sua especificidade quantitativa é limitada, pois ela não é capaz de identificar ROS não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (PERRY *et al.*, 2013).

➤ *Fluorimetria*. Estudos mostram que utilizando a técnica fluorimétrica também pode-se monitorar aspectos mitocondriais em tecidos *in vivo* (Mayevsky e Rogatsky, 2007; Williams *et al.*, 2017). Com sondas que marcam o NADH, é possível ter acesso ao estado redox mitocondrial (Mayevsky e Rogatsky, 2007). Isto porque, altos níveis de NADH indicam maior estado reduzido do cofator (pois pouco está sendo reoxidado pelo CI) e consequentemente de toda a CTE (Mayevsky e Rogatsky, 2007). Além disso, técnicas mais recentes utilizam sondas fluorescentes para componentes mitocondriais específicos (Williams *et al.*, 2017). A proteína *mt-Keima*, por exemplo, tem como alvo a matriz mitocondrial e é utilizada para monitorar a mitofagia (Williams *et al.*, 2017). Logo, mitocôndrias marcadas e que estão sendo degradadas no lisossomo ficam vermelhas (WILLIAMS *et al.*, 2017).

➤ *Respirometria Cutânea - PpIX-TSLT*. Esta técnica inovadora foi testada em cerca de 30 voluntários e compromete-se a avaliar a tensão e consumo de O₂ mitocondrial pela pele (Harms, Stolker e Mik, 2016). Apesar de faltarem evidências que comprovem sua efetividade, a PpIX-TSLT tem potencial relevância em termos clínicos, pois pode ser um modo de avaliar biomarcadores de disfunções mitocondriais em pacientes (FINSTERER & ZARROUK-MAHJOUB, 2018).

2. A temperatura como um fator que interfere no funcionamento mitocondrial

Uma vez posto este caráter plural da mitocôndria, muitos fatores também podem atuar como interferentes em suas atividades. Diante disso, optou-se por investigar especificamente a influência da temperatura, e de quais maneiras ela pode afetar o funcionamento mitocondrial.

2.1 A Temperatura

A temperatura é um fator abiótico, o qual é capaz de afetar processos físicos e químicos de maneira ubíqua ([Storch, 2012](#)). De modo geral, um aumento na temperatura precede um aumento na velocidade de reações químicas. Isso ocorre pois, segundo a teoria da termodinâmica, não apenas a energia cinética total do sistema aumenta, como também a energia de ativação de determinada reação é ultrapassada mais rapidamente ([TATTERSALL et al., 2012](#)).

Por outro lado, os processos biológicos - sejam eles bioquímicos, comportamentais ou fisiológicos - possuem uma *curva de performance térmica* (TPC) (**Figura 8**). Ela apresenta não só um estágio exponencial - em que a taxa de performance cresce exponencialmente conforme há o aumento na temperatura a partir de uma *temperatura crítica* (T_{crit}) *mínima*; mas também tem uma fase platô, na qual se atinge uma faixa que compreende a *temperatura ótima* (T_{opt}); e por último uma fase final onde há um declínio acentuado, na qual as taxas dos processos diminuem drasticamente com o aumento exacerbado da temperatura, chegando a uma T_{crit} *máxima*, em que a performance é zero ([SCHULTE, 2015](#)).

Finalmente, o quanto uma reação química ou processo biológico é dependente da temperatura pode ser expresso pelo *coeficiente de temperatura* (Q_{10}) ([Mundim et al., 2020](#)). Este termo reflete o quanto a taxa de uma reação varia ao se alterar a temperatura em 10 unidades ($^{\circ}\text{C}$ ou K) ([Chaui-Berlinck et al., 2002](#)). Desta forma, o Q_{10} pode ser um bom preditivo da primeira fase (exponencial) da TPC ([Schulte, 2015](#)). Albert Bennett (1984) resumizou algumas informações que podem ser extraídas da variável: um Q_{10} igual a 1 indica

independência térmica; já à medida que Q_{10} cresce, maior é a dependência que a temperatura exerce sobre o processo; por fim, um Q_{10} menor que 1 reflete uma relação inversa, ou seja, quanto menor a temperatura, maior a taxa em que ocorre tal processo (BENNETT, 1984).

Grande parte dos processos biológicos possui Q_{10} entre 2 e 3. Isto é, a cada aumento de 10°C, a taxa de performance do processo aumenta de 2 a 3 vezes (Adamson, Gandy e James, 1965; Reyes, Pendergast e Yamazaki, 2008). No entanto, reconhece-se que existem exceções e limitações do Q_{10} (ADAMSON, GANDY & JAMES, 1965; XIAO, 2000; GILLOOLY *et al.*, 2001; CHAUI-BERLINCK *et al.*, 2002; HALSEY *et al.*, 2015; MUNDIM *et al.*, 2020).

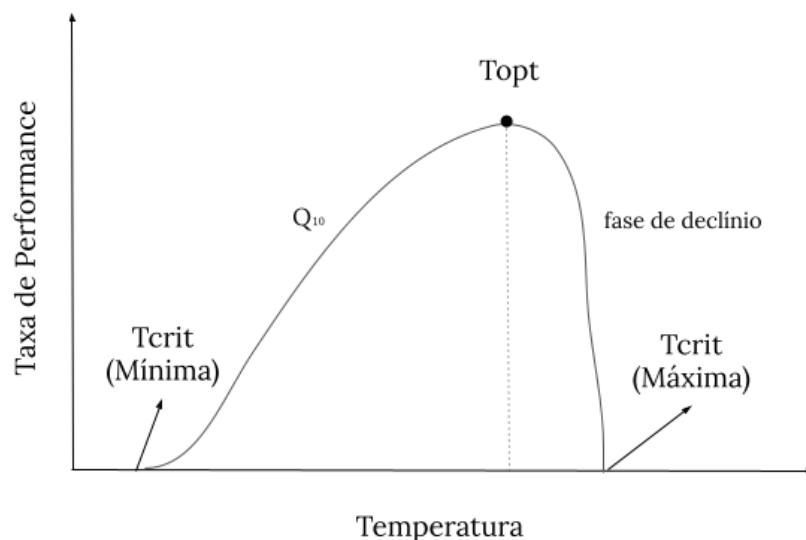


Figura 8. Uma Curva de Performance Térmica (TPC). O primeiro estágio possui caráter exponencial, e sua inclinação pode ser explicada pelo Q_{10} . Após atingir a $Topt$, há um rápido declínio na performance conforme aumenta-se a temperatura. Os dois extremos são pontos em que a performance é igual a 0, as chamadas temperaturas críticas ($Tcrit$). Fonte: Adaptado de Schulte, 2015.

2.2 Efeitos Bioquímicos

Toma-se como ponto de partida dessa discussão, então, os efeitos bioquímicos da temperatura. De acordo com Tattersall *et al.* (2012), além do efeito direto da temperatura nas velocidades de reação, há o fator adicional das *enzimas*. Elas também afetam a velocidade das reações devido à sua propriedade

de catálise. Mais ainda, elas igualmente podem ser afetadas pela temperatura - a qual é capaz de modificar estruturas proteicas (BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

Proteínas isoladas possuem comportamento não-linear condizente com TPCs: sob maiores temperaturas, as proteínas se tornam mais flexíveis, o que permite que mudanças conformacionais ocorram mais rapidamente, aumentando a velocidade das reações até uma T_{opt} (Tattersall *et al.*, 2012; Schulte, 2015). Entretanto, após certo momento, há um decréscimo de atividade, causada pela desnaturação proteica que é induzida por temperaturas extremas (TATTERSALL *et al.*, 2012; SCHULTE, 2015).

Medir esta sensibilidade térmica enzimática, contudo, é um desafio. Graças à característica tempo-dependente da desnaturação proteica, quanto mais tempo as enzimas são submetidas a temperaturas altas, maior a chance delas se desnaturarem, o que pode culminar numa T_{opt} aparente menor (Schulte, 2015). Além disso, a T_{opt} de algumas enzimas se encontram muito abaixo de suas temperaturas de desnaturação (SCHULTE, 2015).

Algumas teorias e modelos conseguem esclarecer o comportamento das TPCs enzimáticas levando em consideração outros pontos específicos. Primeiramente, pode ser que existam estados de inativação proteica antes mesmo da desnaturação, o que explicaria esse declínio na curva (Schulte, 2015). Além disso, a dinâmica observada pode ser um reflexo de processos muito mais complexos. Estudos recentes mostram que a temperatura pode influenciar não as conformações em si, mas sim a probabilidade de microestados que aquela proteína pode exibir (Schulte, 2015). Há também modelos que tentam explicar as TPCs enzimáticas sem cair nos impasses da desnaturação. Desta forma, alguns estudos apontam para o fato de que a temperatura, inesperadamente, afeta funções bioquímicas básicas das proteínas, como a energia livre de ativação de Gibbs ($\Delta G^\ddagger$) e a constante de Michaelis (k_m) (SCHULTE, 2015).

É necessário também atentar-se para outro aspecto bioquímico, pertinente ao ambiente enzimático, sobretudo ao examinar os efeitos da temperatura sobre a respiração celular. Geralmente, as discussões são realizadas com enzimas presentes em um ambiente aquoso. No entanto, *in vivo*, muitas das enzimas

essenciais para o metabolismo energético se encontram inseridas na membrana mitocondrial (Schulte, 2015). Assim, as propriedades da membrana também são indispensáveis, pois afetam diretamente as enzimas nela embebidas e seus respectivos k_m (Schulte, 2015). A fluidez da membrana é altamente dependente tanto da proporção lipídica (lipídeos saturados ou insaturados) quanto da temperatura. Evidências apontam que temperaturas muito altas interferem nas interações lipídeo-proteína e consequentemente afetam a respiração mitocondrial (SCHULTE, 2015).

2.3 Efeitos Mitocondriais (Celulares)

Até os dias atuais, poucos estudos tratam da dependência térmica da mitocôndria em especial. Menos estudado ainda, é como se dá esse efeito da temperatura nas mitocôndrias de animais endotérmicos (vide seção posterior).

Tratando-se de mamíferos, há uma falta de consenso: existem estudos que afirmam que a dependência térmica da mitocôndria de mamíferos é maior sob efeito das temperaturas altas (Newell e Walkey, 1966); e outros que dizem o contrário, que o Q_{10} de certos tecidos em baixas temperaturas é maior (MICHENFELDER & MILDE, 1992; LANIER, 1995).

Já estudos sobre diferentes animais explicitaram que a temperatura pode influenciar a taxa de consumo de O_2 invariavelmente, a qual comporta-se como uma TPC típica (Rottenberg, 1978; Dufour *et al.*, 1996; Jorjani e Ozturk, 1999; Paital e Chainy, 2014; Anderson e Gillooly, 2018). Outros, em concordância, mostram que de fato a temperatura é capaz de "explicar a maior parte das variações nas taxas de respiração mitocondrial nos animais vertebrados", possuindo em média um Q_{10} de 2 (ANDERSON & GILLOOLY, 2018).

ANIMAIS ECTOTÉRMICOS x ENDOTÉRMICOS

Em virtude da escassez de estudos acerca de animais endotérmicos, é necessário fazer aqui uma distinção entre *temperatura ambiente* (T_a) e *temperatura interna corporal* (T_c) ao aplicar os conceitos de dependência térmica a animais endotérmicos.

Organismos *ectotérmicos* são aqueles que dependem primordialmente da Ta como fonte de calor corporal (Clarke e Pörtner, 2010; Tattersall *et al.*, 2012). Como consequência, inúmeros processos biológicos dos animais ectotérmicos são influenciados pela Ta. A temperatura pode atuar em aspectos ontogenéticos, como desenvolvimento e crescimento (Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012). Esses, por sua vez, influenciam a massa corporal. Já essa variação da massa corporal pode gerar alterações em processos metabólicos, fisiológicos e/ou ecológicos nestes animais (ANDERSON-TEIXEIRA, SMITH & MORGAN ERNEST, 2012).

Animais *endotérmicos*, em contrapartida, são aqueles em que a fonte principal de calor é proveniente de uma alta *taxa metabólica* (TM), alcançada às custas de mecanismos termogênicos (Clarke e Pörtner, 2010; Tattersall *et al.*, 2012). Assim, eles em geral mantêm sua Tc relativamente constante, a despeito da Ta (Clarke e Pörtner, 2010; Tattersall *et al.*, 2012; Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012). Em vista disso, grande parte das atividades biológicas de animais endotérmicos irá depender principalmente da Tc.

Entretanto, o metabolismo dos animais endotérmicos é um dos poucos processos que a Ta também pode perturbar de maneira considerável (Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012). De fato, com relação ao Q_{10} mitocondrial, segundo Berner (1999), as mitocôndrias de um animal endotérmico possuem Q_{10} mais alto do que as de um animal ectotérmico. O valor mais alto de Q_{10} obtido para mitocôndrias de rato foi de 5,46 (Berner, 1999). Ainda, como em ectotérmicos, muitas de suas atividades fisiológicas obedecem uma TPC (OSWALD & ARNOLD, 2012).

Em segundo lugar, a homeostase térmica dos animais endotérmicos (ou seja, a manutenção da Tc) em ambientes com temperaturas variáveis é alcançada por meio de mecanismos termorregulatórios, sejam eles de defesa ao calor ou ao frio (Oswald e Arnold, 2012). Porém, nos dois extremos (Ta extremamente altas ou extremamente baixas), a termorregulação e consequentemente o metabolismo de endotérmicos também podem ser prejudicados (OSWALD & ARNOLD, 2012).

Assim sendo, em ambientes muito quentes, os animais endotérmicos saem de sua faixa de Tc normotérmica, o que irá causar um aumento passivo na sua

TM ([Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012](#)). Por outro lado, para sobreviver em locais onde a temperatura é extremamente baixa, eles também precisam aumentar drasticamente sua TM, a fim de manter a Tc ([TEULIER *et al.*, 2010](#); [ANDERSON-TEIXEIRA, SMITH & MORGAN ERNEST, 2012](#)).

Frente a isso, toma-se como princípio que a temperatura (tanto Ta quanto Tc) é de fato capaz de influenciar o metabolismo energético de animais ectotérmicos e endotérmicos, mesmo que de forma distinta.

EFEITOS DIRETOS

Diante deste panorama, as consequências da temperatura diretamente sobre as funções mitocondriais dos animais podem ser diversas. É válido ressaltar que variações são comuns, à medida que os estudos são feitos em diferentes organismos, tecidos, tempos e faixas de exposição. Aqui reunidos se encontram artigos acerca de hipotermia, hipertermia, animais ectotérmicos, endotérmicos, humanos, exposição aguda ou crônica. Apesar disto, muitas destas pesquisas apresentam concordância no que tange o caráter TPC do funcionamento mitocondrial¹. A seguir, faz-se uma síntese de alguns destes achados, os quais se encontram resumidos na **Tabela 1**.

Estudos em mitocôndrias isoladas e células de ratos ([White *et al.*, 2012](#); [Jarmuszkiewicz *et al.*, 2015](#)) sumarizam os efeitos do estresse térmico (*hipertermia*) sobre as mitocôndrias. Em conjunto, os resultados mostram que temperaturas acima das toleradas induzem aumento em praticamente todas as taxas relacionadas à respiração mitocondrial. Contudo, este aumento vem atrelado a uma diminuição da eficiência, explicitada pelo aumento do desacoplamento e por uma diminuição na RCR. ([WHITE *et al.*, 2012](#); [JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2015](#)).

¹ Aponta-se aqui uma ressalva: de acordo com o comportamento TPC da respiração celular, o que se espera de forma geral é um aumento da performance mitocondrial até T_{opt}, a partir da qual os processos começam a declinar. Aqui, condições de "hipertermia" equivalem a uma temperatura de exposição acima da normotérmica exibida naturalmente pelo animal. Porém, nem todos os artigos necessariamente estudaram os efeitos acima de T_{opt}, a partir da qual os componentes mitocondriais exibem declínio na performance, muitos revelando somente o caráter exponencial da curva. Analogamente, "hipotermia" condiz meramente com a temperatura de exposição abaixo da normotérmica do animal.

Animal	Efeito Mitocondrial	Faixa Térmica	Autores
Moluscos	↑OXPHOS, ↑ROS, ↓RCR, ↑ <i>Leak</i>	Hipertermia	Abele <i>et al.</i> , 2002 (mitocôndria isolada de marisco)
Crustáceos	↑OXPHOS, ↓RCR, ↑ <i>Leak</i> , ↑Lactato (glicólise)	Hipertermia	Iftikar, MacDonald e Hickey, 2010 (células de duas espécies)
Peixes	↑OXPHOS, ↑ROS, ↓RCR, ↑ <i>Leak</i> , ↑Produção de ATP, ↑Liberação do cit c, ↑Lactato (glicólise)	Hipertermia	Iftikar e Hickey, 2013 (células) Christen <i>et al.</i> , 2018 (mitocôndrias isoladas)
Anfíbios	↑Consumo de O ₂ , ↑ Produção de ATP, ↑ROS, ↑Desacoplamento	Hipertermia	Roussel e Voituron, 2020 (mitocôndria isolada de sapos)
Aves	↑ROS, ↑Atividade de Enzimas Antioxidantes, ↓Atividade de Enzimas da CTE	Hipertermia	Yang <i>et al.</i> , 2010 (mitocôndria isolada de fígado de galinha)
Ratos	↑OXPHOS, ↑/↓ROS, ↓RCR, ↑ <i>Leak</i> , ↑Consumo de O ₂ , ↑ Atividade de Complexos, ↑Produção de ATP, ↓ΔΨm, ↑Desacoplamento	Hipertermia	Zukiene <i>et al.</i> , 2010 (mitocôndria isolada de coração) White <i>et al.</i> , 2012 (células de cérebro) Jarmuszkiewicz <i>et al.</i> , 2015 (mitocôndria isolada de músculo esquelético)
Insetos	↓OXPHOS, ↓Produção de ATP, ↓RCR	Hipotermia	Colinet, Renault e Roussel, 2017 (mitocôndria isolada de <i>Drosophila</i>)
Caninos	↓Consumo de O ₂	Hipotermia	Michenfelder e Milde, 1992 (cérebro)
Camundongos	↓OXPHOS, ↑ΔΨm, ↑ROS	Hipotermia	Ali <i>et al.</i> , 2010 (mitocôndria isolada de cérebro)
Camundongos	↓OXPHOS, ↓Atividade de Complexos, ↑Acoplamento	Hipotermia	Pamenter, Lau e Richards, 2018 (células permeabilizadas de cérebro)
Humanos	↓OXPHOS, ↓ROS, ↓Consumo de O ₂ (Q ₁₀ = 2,2)	Hipotermia	Hendriks <i>et al.</i> , 2019 (células e mitocôndrias isoladas de rim)
Aves	↑OXPHOS	Hipotermia (aclimação)	Teulier <i>et al.</i> , 2010 (mitocôndria isolada de músculo esquelético de patos)
Mamíferos	↓OXPHOS, ↓Produção de ATP, ↓Oxidação de substrato, ↓ <i>Leak</i>	Hipotermia (adaptação)	Polymeropoulos, Oelkrug e Jastroch, 2017 (mitocôndrias isoladas de porco-espinho)
Ectotérmicos, Endotérmicos	Componentes da respiração mitocondrial possuem comportamento "TPC"	Toda	Rottenberg, 1978 (mitocôndria isolada de fígado de rato); Dufour <i>et al.</i> , 1996 (mitocôndria isolada de fígado de rato); Jorjani e Ozturk, 1999 (linhagens de células de mamíferos); Paital e Chainy, 2014 (mitocôndria isolada de caranguejo); Anderson e Gillooly, 2018 (meta-análise, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
Ratos	"TPC", Dependência térmica de proteínas mitocondriais (Q ₁₀ = 4)	Toda	Lemieux, Tardif e Blier, 2010 (mitocôndria isolada de coração)

Tabela 1. Resumo de Estudos Seleccionados que Demonstram o Efeito da Temperatura nas Atividades Mitocondriais. Há artigos que se voltam para os mecanismos compensatórios que as mitocôndrias de certos animais (aclimatados ou adaptados) podem apresentar. Alguns artigos também examinam o comportamento da atividade mitocondrial sob ambos os extremos, compreendendo toda a faixa térmica ao redor de T_{opt}. ↑ΔΨm: Hiperpolarização. ↓ΔΨm: Despolarização.

Então, coletivamente, o que se observa (**Tabela 1**) nas mitocôndrias dos diversos animais à medida que a temperatura cresce é: um aumento nas taxas respiratórias (OXPHOS, consumo de O₂, produção de ATP, atividade de complexos, *Leak*) e na produção de ROS (também na atividade de enzimas antioxidantes), associados a uma diminuição na eficiência respiratória (aumento do desacoplamento mitocondrial e despolarização do $\Delta\Psi_m$), e um aumento na produção de lactato pela via glicolítica (para lidar com a demanda de ATP), além da liberação do cit c.

Além disso, uma vez ultrapassada a T_{opt} , o declínio nas taxas respiratórias começa a aparecer: estudos com mitocôndrias de coração de rato sob extremo estresse térmico (a partir de 40°C) mostraram que elas realmente exibem diminuição na OXPHOS, na atividade de enzimas da CTE e na capacidade de produção de ATP (RCR) (ZUKIENE *et al.*, 2010; POWER *et al.*, 2014).

Tais resultados podem ser derivados das alterações na integridade da membrana mitocondrial e na conformação de proteínas, provocadas pelo calor (Iftikar, MacDonald e Hickey, 2010). Segundo Lepock *et al.* (1987), Jarmuszkiewicz *et al.* (2015) e Salin *et al.* (2015), à medida que a temperatura aumenta, a MIM começa a apresentar alterações e isso pode induzir tanto um aumento na sua permeabilidade a prótons, quanto mudanças conformacionais nas proteínas nela embebidas. Não somente, conforme a temperatura passa de T_{opt} e atinge T_{crit} máxima, a diminuição na respiração mitocondrial pode ser explicada puramente pela desnaturação de suas proteínas (LEPOCK *et al.*, 1987).

Já no que se refere à *hipotermia*, o artigo de Ali e colaboradores (2010) é capaz de explicitar muito do que acontece. Quando células de camundongo foram submetidas a temperaturas baixas, o resultado foi diminuição em grande parte dos componentes relacionados à respiração mitocondrial (OXPHOS, *Leak*, produção de ATP) e um aumento inesperado na produção de ROS (ALI *et al.*, 2010).

Assim, conforme apresentado nos estudos sobre diversos animais (**Tabela 1**), as consequências da hipotermia geralmente são: uma diminuição das taxas ligadas à respiração mitocondrial, uma diminuição das atividades dos complexos mitocondriais, um aumento (hiperpolarização) do $\Delta\Psi_m$ e do acoplamento

mitocondrial e um aumento ou maior proporção de ROS. Apesar disso, artigos mostram que mecanismos compensatórios podem aumentar a eficiência mitocondrial na hipotermia: Teulier *et al.* (2010) demonstraram um aumento na OXPHOS após aclimação ao frio; Polymeropoulos, Oelkrug e Jastroch (2017) evidenciaram também uma diminuição no *leak* (como mecanismo adaptativo para manter a eficiência respiratória sob baixas temperaturas).

Acerca das alterações nos níveis de ROS que foram observadas, Ali e colaboradores (2010) e Blier, Lemieux e Pichaud (2014) levantam algumas hipóteses. Segundo eles, temperaturas fora da faixa ideal para o animal (no caso, roedores) podem não só afetar a CTE, mas também aumentar a produção de ROS (ALI *et al.*, 2010; BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

Um argumento é que sob temperaturas extremas (tanto em altas quanto em baixas) a mitocôndria eleva sua produção de ROS devido a uma redução da capacidade respiração em detrimento da oferta de substratos (Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Como possível explicação, sob temperaturas altas, há o aumento exacerbado da capacidade catalítica de elementos relacionados ao fornecimento de substratos e ao CAC, o que pode aumentar a oferta de O₂ e induzir o aumento da formação de ROS no Estado 3 (BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

Sob temperaturas baixas, em contrapartida, a mitocôndria sofre uma redução da atividade da CTE e síntese de ATP, o que pode estar relacionada com um decréscimo da atividade do CV (ATP sintase) induzido pela hipotermia (Ali *et al.*, 2010; Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Este decréscimo na atividade da ATP sintase pode ocasionar um aumento no $\Delta\Psi_m$ (Ali *et al.*, 2010). A hiperpolarização por si só já está relacionada ao aumento na produção de ROS (Ali *et al.*, 2010). Mas, somando-se a isso, a redução da atividade da ATP sintase causa também uma diminuição no consumo de O₂, possibilitando um aumento local de O₂ e consequentemente da produção de ROS (Ali *et al.*, 2010; Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Como resultado, em temperaturas baixas também é possível observar um aumento no conteúdo mitocondrial a fim de lidar com o excesso de ROS (BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

Outro ponto importante é que o aumento dos níveis de ROS em resposta à hipotermia não é necessariamente patológico. Segundo Ali *et al.* (2010), as ROS

podem possuir papel sinalizador para indução da atividade de UCPs, o que culminaria num aumento da termogênese sem tremores no animal, em virtude das baixas temperaturas (ALI *et al.*, 2010).

Salienta-se, também, que nem todos os resultados obtidos são uniformes. A produção de ROS na hipotermia, por exemplo, também pode diminuir (Tissier *et al.*, 2013; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2015; Hendriks *et al.*, 2019). Mas, é possível que essa diminuição não acompanhe o grande decréscimo na respiração, e justamente esse desequilíbrio é o que pode causar danos celulares ou eliciar respostas fisiológicas (HENDRIKS *et al.*, 2019).

Entrando num escopo mais específico, como a mitocôndria possui vários "blocos funcionais" distintos, a temperatura também pode afetar diferencialmente cada etapa respiratória, por fim influenciando a integridade funcional da mitocôndria (BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

Segundo Hardewig, Pörtner e Peck (1999), o Estado 3 da respiração mitocondrial em peixes possui um Q_{10} de aproximadamente 2,5. Por sua vez, o Estado 4 possui Q_{10} bem mais alto para a mesma faixa de temperatura (valor em torno de 4). Essa diferença entre as sensibilidades térmicas dos processos pode levar a um "desacoplamento mitocondrial e eficácia comprometida da OXPHOS, se a T_c deste animal aumentar" (HARDEWIG, PÖRTNER & PECK, 1999).

Neste segmento, um estudo feito com mitocôndrias de coração de ratos revelou características importantes sobre a sensibilidade térmica de diferentes componentes mitocondriais, e como temperaturas extremas podem levar a danos celulares (Lemieux, Tardif e Blier, 2010; Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). O trabalho de Lemieux, Tardif e Blier (2010) investigou a dependência térmica de diferentes estados e proteínas mitocondriais. Seus resultados demonstram que no animal endotérmico (rato), a atividade dos complexos CI a CIII se comporta como uma TPC típica, onde T_{opt} está em torno de 30°C e há um declínio em 40°C.

Contudo, destaca-se que na faixa de 5 a 15°C (isto é, hipotermia), o Q_{10} do Estado 3 é em torno de 4 e a única proteína que possui este mesmo valor e atividade é a PDC² (Lemieux, Tardif e Blier, 2010; Blier, Lemieux e Pichaud,

² A atividade do complexo piruvato desidrogenase (PDC) constitui um passo fundamental na respiração mitocondrial, pois limita a entrada de substratos no CAC. Assim, ela é capaz de influenciar a taxa máxima da OXPHOS (LEMIEUX, TARDIF & BLIER, 2010; BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

2014). Desta maneira, hipotetiza-se que a PDC tenha papel fundamental na sensibilidade térmica da respiração mitocondrial no frio, agindo como uma proteína "gatekeeper" (Lemieux, Tardif e Blier, 2010; Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Já na faixa normotérmica do animal (25 a 35°C), a atividade do Estado 3 possui similaridade não só com a da PDC como também de outros processos e componentes (Estado 4, CI-CIV). Este fato sugere que em temperaturas às quais o animal está adaptado (normotermia) existam várias proteínas agindo como pontos de controle da respiração mitocondrial (LEMIEUX, TARDIF & BLIER, 2010; BLIER, LEMIEUX & PICHAUD, 2014).

EFEITOS INDIRETOS

Adicionalmente, a temperatura também pode ser capaz de afetar outros processos celulares fundamentais que, de modo indireto, interferem no funcionamento mitocondrial.

A temperatura pode afetar a disponibilidade de O₂, limitando suas concentrações (Pörtner e Knust, 2007). Em resumo, isso ocorre porque, além da temperatura alta diminuir a solubilidade do O₂ em meio celular, ela aumenta a demanda por oxigênio (pois a mitocôndria precisa lidar com o aumento da respiração celular) (PÖRTNER & KNUST, 2007).

Por último, cascatas de sinalização em resposta às variações térmicas também podem influenciar a atividade mitocondrial. O sinal térmico é conduzido principalmente por canais termossensíveis (família dos canais receptores de potencial transitório - TRP), os quais possuem diversos subtipos e ativados por diferentes faixas de temperatura (Pedersen, Owsianik e Nilius, 2005). Eles estão presentes em inúmeras células e estudos recentes mostram que alguns podem, de fato, regular proteínas mitocondriais (Kumar *et al.*, 2018). Por exemplo, a ativação do canal TRPV4 - o qual é ativado por temperaturas moderadas (acima de 27°C) - pode provocar mudanças na respiração celular, no $\Delta\Psi_m$ e na morfologia mitocondrial (KUMAR *et al.*, 2018).

2.4 Efeitos Sistêmicos

O último ponto a ser levantado refere-se aos possíveis efeitos sistêmicos da temperatura. Curvas TPC e dependências térmicas (Q_{10}) de *processos fisiológicos sistêmicos* podem ser equivalentes às TPCs e dependências térmicas das *atividades celulares* que constituem estes fenômenos. Neste sentido, Tattersall *et al.* (2012) afirmam que as "sensibilidades térmicas de atividades biológicas e fisiológicas a nível celular resultam em sensibilidades térmicas similares de sistemas e organismos inteiros". Corkrey e colaboradores (2012) ainda postulam que "a estabilidade térmica das proteínas é uma propriedade unificadora na evolução e adaptação da vida na Terra".

Neste sentido, uma teoria - a chamada *teoria metabólica da ecologia* (MTE), proposta por Brown e colaboradores (2004), foi elaborada para explicar como a temperatura, agindo sobre componentes celulares - a saber, a mitocôndria - pode impactar processos sistêmicos, como a TM dos animais e, em última instância, afetar a sobrevivência das espécies (BROWN *et al.*, 2004).

A MTE se baseia num modelo matemático, a *dependência térmica universal* (UTD) (Gillooly *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004). A UTD combina o efeito da temperatura e massa corporal nas taxas biológicas dos animais em uma única equação ($B = B_0 M^\alpha e^{-E/\kappa T}$)³. Argumenta-se que este modelo "caracteriza os efeitos diretos da temperatura não só na cinética de reações bioquímicas, como também em processos a nível de organelas e células, na TM de organismos inteiros e em muitas outras atividades biológicas controladas pela TM" (GILLOOLY *et al.*, 2006; BROWN & SIBLY, 2012).

Assim, a MTE prevê quantitativamente que a TM - a princípio influenciada pela temperatura e massa - é um dos fatores ecológicos unificadores da biologia, tanto na organização individual quanto a nível ecossistêmico (BROWN *et al.*, 2004; BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

³ "Onde B, a variável dependente, é a taxa de algum processo ecológico mediado biologicamente; B₀ é uma constante de normalização que tipicamente varia com a natureza do processo, tipo de organismo, e contexto ambiental; M^α é o termo da lei de potência da massa corporal (M sendo a massa corporal e ^α é o expoente de escalamento) e e^{-(E/kT)} é o termo exponencial da dependência térmica (onde E é a energia de ativação, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin" (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

Os três argumentos básicos da MTE são: 1) o metabolismo energético é um processo fundamental, tanto nos organismos como nos ecossistemas, e a TM equivale, na sua essência, à transformação de energia e síntese de ATP. 2) processos metabólicos são cruciais para a ecologia, já que as interações entre organismos e sistema se dá através de fluxos de energia. 3) é possível utilizar processos puramente químicos e físicos (como a temperatura) para modelar quantitativamente processos biológicos (como a TM), algo que se estende para boa parte da ecologia (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

Fortalecendo esta visão, estudos mostram que a dependência térmica das taxas de respiração em organismos inteiros (inter e intra específicos) são estatisticamente indistinguíveis daquelas de mitocôndrias isoladas (Anderson e Gillooly, 2018). Isto parece demonstrar - além do fato de que processos como a adaptação e aclimação parecem possuir pouco impacto nas taxas de respiração mitocondrial - que, em muitos dos casos, os efeitos da temperatura sobre componentes celulares isolados podem ser escalados para nível de organismo na forma da TM (ANDERSON & GILLOOLY, 2018).

Sob este paradigma, pode-se afirmar que toda a MTE se baseia numa ideia central: a de que *os efeitos da temperatura observados nos organismos advêm primariamente dos efeitos termodinâmicos que atuam sobre as reações químicas, as quais ocorrem majoritariamente no interior da mitocôndria* (GILLOOLY *et al.*, 2006).

Concomitantemente, desde sua publicação em 2004, a MTE tem recebido sua parcela de críticas. Segundo Clarke (2004, 2006) e Clarke e Fraser (2004), os efeitos da temperatura são indiretos e não podem ser preditos a partir de princípios como a UTD. O argumento é que as interações bioquímicas e termodinâmicas no metabolismo são extremamente complexas, e que a teoria não considera a entropia que afeta os mecanismos enzimáticos (somente entalpia) nem os *trade-offs* que ocorrem a nível celular e evolutivo, como a aclimação. O'Connor e colegas (2007), analogamente, afirmam que o modelo mecanicista não pode ser testado, não é adequado e nem universal.

A saber, mecanismos adaptativos, como a aclimação, podem realmente deslocar as TPCs de mitocôndrias dos animais, variando a T_{opt} da respiração

celular (Somero, 2002). Por serem fatores capazes de causar uma variabilidade nas TPCs de processos moleculares, eles podem então, ser refletidos de forma distinta na fisiologia dos organismos (TATTERSALL *et al.*, 2012).

Por fim, estudiosos concordam na conclusão de que, apesar de muitas das suposições da MTE serem corroboradas na prática, algumas ainda precisam de reformulação para levar em conta certas variações que podem ser encontradas (WHITE, PHILLIPS & SEYMOUR, 2005; PRICE *et al.*, 2012).

IMPACTOS CLÍNICOS

A despeito da falta de estudos que tomem como premissa a MTE e façam a ponte entre a atuação da temperatura nos processos moleculares, celulares e sistêmicos, algumas linhas de pesquisa se voltam para estudo do impacto das variações de temperatura (hipotermia e hipertermia) sobre os processos biológicos, com a atenção voltada para sua aplicabilidade clínica (**Tabela 2**).

Em resumo, a temperatura afeta distintamente vários processos sistêmicos. Não obstante, grande parte desses efeitos aparenta ter conexão com o funcionamento mitocondrial.

Efeito Sistêmico	Faixa Térmica
Conservação de Órgãos para Transplante	Hipotermia
Tratamento de Lesões Isquêmicas	Hipotermia
Tratamento da Obesidade (Indução da Termogênese)	Hipotermia
Fator de Risco para Doenças Neurodegenerativas	Hipotermia
Combate a Infecções (Febre)	Hipertermia
Terapia Anti-Câncer	Hipertermia
Indução de Lesões Teciduais	Hipertermia

Tabela 2. Resumo de Alguns Efeitos da Temperatura (Hipotermia e Hipertermia) em Fenômenos Sistêmicos.

Os efeitos da *hipotermia* a nível sistêmico mostram-se complexos. Apesar disso, muitos deles podem estar relacionados a alterações mitocondriais. A curto prazo, a hipotermia profunda possui caráter protetor para tecidos que necessitem uma diminuição momentânea da TM, como é o caso de órgãos para transplante (Hendriks *et al.*, 2019) e tecidos que sofreram lesões isquêmicas (Lanier, 1995). Conforme apresentado, a hipotermia diminui as velocidades de reação (Belzer e Southard, 1988), desacelerando a respiração mitocondrial e o consumo de O₂, mas mantendo o acoplamento (Lanier, 1995; Pamenter, Lau e Richards, 2018). Assim, durante a hipotermia, tecidos como o cérebro toleram a degradação enzimática, o estresse oxidativo e hipóxia/isquemia por mais tempo (BELZER & SOUTHARD, 1988; LANIER, 1995; PAMENTER, LAU & RICHARDS, 2018).

A hipotermia também possui propriedades que podem ser relevantes no tratamento da obesidade. Como visto, a hipotermia pode culminar no aumento das ROS, e estas podem servir como sinalizadoras para a ativação das UCPs, que induzem a termogênese e o gasto energético (Ali *et al.*, 2010). Deste modo, iniciar a cascata fisiológica de resposta ao frio nos endotérmicos pode ser interessante. É possível induzir esta resposta ao se ativar, por exemplo, os canais TRPM8, os quais respondem a temperaturas baixas e também a fármacos como o mentol, que mimetizam o frio (Ma *et al.*, 2012). Assim, esta ativação pode levar a uma resposta fisiológica de defesa ao frio, a qual evoca a ativação da termogênese no BAT, consequentemente aumentando o gasto energético e a TM do organismo (MOELLERING & SMITH, 2012).

Indo de encontro aos efeitos benéficos da hipotermia, exposições a longo prazo podem se mostrar prejudiciais. Apesar de alguns estudos mostrarem que a aclimação de animais a temperaturas hipotérmicas auxiliam na resiliência da respiração mitocondrial (Teulier *et al.*, 2010), outros apontam para o malefício da hipotermia. Órgãos expostos à hipotermia podem ter uma proporção de ROS mitocondrial aumentada, o que tende a causar danos teciduais a longo prazo (HENDRIKS *et al.*, 2019).

A hipotermia também parece ter papel deletério em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA). O efeito da hipotermia é o aumento de *proteína tau fosforilada* (levando à formação dos agregados

neurofibrilares - marcadores da DA). Por isso, a hipotermia é sugerida como modelo *in vitro* para o estudo desta doença (Johnson, Htway e Hernandez, 2018). Os agregados neurofibrilares - que podem ser induzidos pela hipotermia - afetam forma e função mitocondrial como a respiração celular, metabolismo de cálcio, biossínteses, mitofagia e produção de ROS. Isto favorece, assim, a disfunção neuronal na DA (EBNETH *et al.*, 1998; PÉREZ, JARA & QUINTANILLA, 2018).

Ainda num contexto neuropatológico, disfunções mitocondriais e hipotermia podem atuar como uma via de mão dupla: de fato, descobriu-se que o cérebro de pacientes com disfunções mitocondriais é hipotérmico (Rango *et al.*, 2014). Isto pode acontecer porque a mitocôndria defeituosa exibe menor taxa de respiração celular (Rango *et al.*, 2014) e, como a termogênese mitocondrial é a grande responsável pela manutenção da Tc, estes pacientes exibem hipotermia cerebral. Apesar da diminuição metabólica poder ser protetora em alguns tecidos, ela acomete a atividade energética neuronal (Rango *et al.*, 2014). Por isso, estes pacientes geralmente apresentam neuropatias (RANGO *et al.*, 2014).

Já acerca da *hipertermia*, seu caráter dual também é evidente. Altas temperaturas afetam a velocidade da OXPHOS mas, em geral, isto vem acompanhado de um declínio na efetividade da respiração celular. A curto prazo, as *proteínas do choque térmico* (HSP), presentes em quase todos os organismos, podem ser capazes de minimizar o efeito deletério da temperatura e proteger a mitocôndria (Heckathorn, Downs e Coleman, 1999). A longo prazo, porém, alguns tecidos específicos, como por exemplo os testículos, podem ser profundamente afetados pela temperatura alta (Setchell, 2018). Mais ainda, os efeitos danosos nesse tecido podem estar relacionados com o aumento de ROS e liberação do cit c (SETCHELL, 2018).

Apesar de não tão claro o envolvimento mitocondrial, em certas circunstâncias a hipertermia também pode ser benéfica: a febre, por exemplo, é capaz de auxiliar no combate a patógenos (Vertrees *et al.*, 2002; Lemieux, Tardif e Blier, 2010); e, para eliminar células tumorais, a hipotermia terapêutica também tem se mostrado eficaz para certos tipos de câncer (VERTREES *et al.*, 2002).

IMPACTOS ECOLÓGICOS

Para finalizar, o estudo da dependência térmica da mitocôndria também pode ser um relevante artifício para a conservação e o manejo de espécies em face das mudanças climáticas.

Em geral, acredita-se que espécies ectotérmicas serão as mais afetadas pelas mudanças climáticas (Boyer e Jetz, 2012; Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012; O'Connor e Bruno, 2012). Estudos com estes animais evidenciaram que o sucesso ecológico de uma espécie pode estar relacionado a uma maior plasticidade da respiração mitocondrial em resposta a temperaturas extremas.

Aumentos na densidade de mitocôndrias, na atividade basal de enzimas *gatekeeper* (como a PDC) e nas taxas de respiração mitocondrial podem conferir vantagem a espécies que lidam com o frio (Johnston *et al.*, 1994; Fanguie, Richards e Schulte, 2009; Blier, Lemieux e Pichaud, 2014; Colinet, Renault e Roussel, 2017). Já sob altas temperaturas, o florescimento de certas espécies pode resultar de uma maior estabilidade dos componentes mitocondriais, um aumento na integridade da membrana mitocondrial e uma maior expressão de HSPs (Johnston *et al.*, 1994; Somero, 2002; Hilton, Clements e Hickey, 2010; Iftikar, MacDonald e Hickey, 2010). Neste sentido, a prevalência de espécies invasoras, por exemplo, pode estar intimamente ligada a sua maior capacidade de resiliência e adaptação mitocondrial sob condições térmicas adversas (IFTIKAR, MACDONALD & HICKEY, 2010).

Uma descoberta recente também mostra que a mitocôndria pode ser um componente essencial na evolução de adaptações a ambientes frios. Evidenciou-se que a tuatara, réptil adaptado a ambientes frios, possui polimorfismo do mtDNA (Macey *et al.*, 2021). Em outras palavras, este vertebrado exibe dois materiais genéticos mitocondriais coexistentes. Fora isso, as análises apontam para a possibilidade de os eventos de *seleção positiva* (beneficial no contexto evolutivo) terem ocorrido em sítios transmembrânicos de complexos proteicos mitocondriais, os CI, CII e CIV (Macey *et al.*, 2021). Hipotetiza-se, então, que a pressão de seleção ambiental (baixas temperaturas) possa ter culminado na divergência do

mtDNA, uma vez que esta consistiu numa vantagem adaptativa do metabolismo energético frente ao frio (MACEY *et al.*, 2021).

Finalmente, evidências mostram que a faixa à qual a mitocôndria pode se sujeitar à aclimação está diretamente ligada ao habitat natural e consequentemente à temperatura que o organismo comumente suporta (Dahlhoff, Somero e George, 1993). Animais já adaptados a ambientes quentes possuem uma performance proteica basal mais alta por conta da temperatura, e operam mais próximo do seu limite de tolerância térmica (Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Portanto, elevações excessivas na temperatura podem levar a uma exacerbação da CTE, culminando em um excesso de ROS nestas espécies, o que pode ser prejudicial (Blier, Lemieux e Pichaud, 2014). Isto implica que mudanças muito drásticas na Ta podem causar impactos severos, mas distintos, na sobrevivência de ectotérmicos adaptados a diferentes temperaturas (BOYER & JETZ, 2012; ANDERSON-TEIXEIRA, SMITH & MORGAN ERNEST, 2012).

Agora, acerca dos animais endotérmicos, estes são de fato menos influenciados pelas mudanças na Ta (Salin *et al.*, 2015). No entanto, como vimos, a temperatura influencia o metabolismo dos animais, inclusive dos endotérmicos. Uma consequência do efeito direto da temperatura na TM é exemplificada no tamanho do cérebro em vários grupos de vertebrados: as dimensões cerebrais correlacionam-se positivamente com a temperatura, provavelmente porque a temperatura dá espaço para uma maior TM, a qual possibilita uma maior oferta de energia cerebral (Gillooly e McCoy, 2014). Mas, uma vez que esta maior TM implica em uma maior necessidade de aquisição de energia, este aumento depende da disponibilidade energética (a qual também é limitada pela temperatura) (ANDERSON-TEIXEIRA, SMITH & MORGAN ERNEST, 2012).

Em adição, sob temperaturas extremas, a fisiologia dos endotérmicos também pode ser perturbada. Apesar da existência de mecanismos termorregulatórios comportamentais e evolutivos nestes animais, a rapidez e intensidade com que as temperaturas extremas se apresentam podem afetar similarmente a sobrevivência dos mesmos.

Evolutivamente, sabe-se que os ectotérmicos são eficientes em se aclimatar a temperaturas variáveis dentro de faixas bem amplas (Boyles *et al.*, 2011).

Alguns poucos endotérmicos possuem esta capacidade "reptiliana" de se adaptar a ambientes com temperatura bastante variável: estudos com um mamífero (porco espinho) adaptado estes ambientes apontam que os mecanismos compensatórios inerentes do animal podem ter sido essenciais para sua adaptação de manter a eficiência da respiração mitocondrial sob temperaturas adversas (Polymeropoulos, Oelkrug e Jastroch, 2017), o que permite que ele atue como um *generalista* (mantendo sua performance dentro de faixas térmicas mais largas) (Figura 9).

Muitos endotérmicos, contudo, são *especialistas* térmicos, e suas TPCs se encontram restritas a faixas bastante estreitas (Boyles *et al.*, 2011; Tattersall *et al.*, 2012). Este é o caso de animais que vivem em latitudes baixas (Anderson-Teixeira, Smith e Morgan Ernest, 2012), pois regiões tropicais possuem menor variação térmica. Sendo assim, estas espécies podem ser altamente afetadas por mudanças na temperatura. Entretanto, ser especialista também pode conferir vantagem na performance: como sua faixa ideal é mais curta, muitos especialistas térmicos possuem maior nível de performance basal do que generalistas (BOYLES *et al.*, 2011; TATTERSALL *et al.*, 2012).

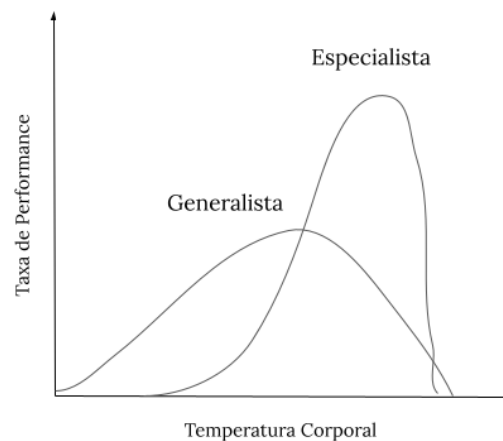


Figura 9. A Diferença entre um Generalista e um Especialista Térmico. O generalista opera bem dentro de uma larga faixa, enquanto que o especialista pode operar melhor ainda, mas sob uma faixa térmica mais restrita.

Neste sentido, é plausível que exista um *trade-off* evolutivo entre ser especialista ou generalista térmico (Boyles *et al.*, 2011). É possível que as mitocôndrias de animais generalistas possam sofrer menos com variações

térmicas, mas as adaptações mitocondriais de especialistas talvez permitam que eles floresçam em locais com T_a média mais alta. Contudo, poucos estudos analisam as divergências entre as TPCs dos dois grupos a nível celular, avaliando as dependências térmicas da performance respiratória destes animais (Boyles *et al.*, 2011). Sobretudo, entender como os diferentes ambientes podem pressionar as adaptações mitocondriais de cada grupo é crucial para o estudo da conservação dos mesmos.

Num contexto comportamental, processos termorregulatórios como o torpor e a hibernação estabilizam o metabolismo energético (por exemplo, ao diminuir a respiração mitocondrial) em condições térmicas desfavoráveis (Polymeropoulos, Oelkrug e Jastroch, 2017). Processos de adaptação fenotípica, como a aclimação, também podem ocorrer: animais bem aclimatados a ambientes muito quentes podem ser capazes de continuar mantendo o metabolismo e T_c normais apesar do aumento na T_a (BOYLES *et al.*, 2011).

Desta maneira, espécies ectotérmicas ou endotérmicas equipadas com melhores mecanismos termorregulatórios e plasticidade adaptativa mitocondrial podem ter maior sucesso em detrimento de outras. Mas, embora eficazes, estes processos conferem proteção até certo ponto (Boyles *et al.*, 2011). Isto significa que o aumento da temperatura do planeta pode ser prejudicial para as espécies, em especial àquelas que já são adaptadas a ambientes quentes ou àquelas que vivem em faixas térmicas ideais muito restritas.

Como explorado, temperaturas altas acima do limite tolerado podem induzir danos irreversíveis à mitocôndria. Isto, por sua vez, é refletido na TM e na homeostase dos organismos. Fica claro, deste modo, que a extensão e a velocidade das mudanças climáticas podem impedir que as espécies se adaptem. Em suma, entender até que limite os mecanismos celulares dos organismos conseguem acompanhar as mudanças térmicas torna-se cada dia mais essencial.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A presente revisão teve como intuito explorar os diversos meios pelos quais a temperatura pode afetar uma única organela. Esta influência térmica, contudo, é extremamente ampla e complexa, visto que a mitocôndria participa não só da produção de energia e regulação do metabolismo dos animais, mas também de grande parte dos processos biológicos essenciais para a manutenção da vida, como o balanço redox, termogênese e morte celular programada.

Os métodos para estudar o funcionamento mitocondrial variam conforme a hipótese a ser testada. Entretanto, é certo que estudos *in vitro* conferem vantagens no que toca a facilidade de manipulação, isolamento das variáveis e, sobretudo, na interpretabilidade dos resultados. Apesar disso, a escassez de estudos *in vitro* que se voltam para a dependência térmica da mitocôndria é de se considerar.

Em linhas gerais, conclui-se que as consequências da temperatura no metabolismo da célula são de natureza puramente termodinâmica e bioquímica, afetando desde a velocidade das reações, até as estruturas lipídicas e proteicas (**Figura 10**). A temperatura afeta a performance das taxas mitocondriais de forma não-linear, mas previsível. Conforme a temperatura cresce, a respiração celular, produção de calor e ROS, e ativação da cascata apoptótica aumentam proporcionalmente. Este aumento alcança um nível máximo, após o qual temperaturas muito altas incitam o declínio das performances de modo geral.

Dado que a taxa metabólica dos organismos é, em sua essência, um reflexo do metabolismo energético mitocondrial, os impactos mitocondriais repercutem, não surpreendentemente, na manutenção da homeostase dos animais. Temperaturas extremas, então, podem afetar profundamente a saúde e sobrevivência das espécies. Em um contexto clínico, a hipotermia e hipertermia podem servir como ferramentas terapêuticas que agem aumentando ou diminuindo o metabolismo mitocondrial. Contudo, estas mesmas temperaturas extremas podem causar danos celulares e teciduais, culminando em patologias.

Sob uma ótica ecológica, entende-se que o aumento da temperatura do planeta pode acarretar sérias consequências para o sucesso evolutivo de todos os animais, sejam eles ectotérmicos ou endotérmicos. Espécies mais bem adaptadas às temperaturas extremas podem possuir vantagem sobre as demais. No entanto, devido à velocidade em que as mudanças climáticas caminham, a extensão dos danos térmicos sobre os organismos pode ser vasta.

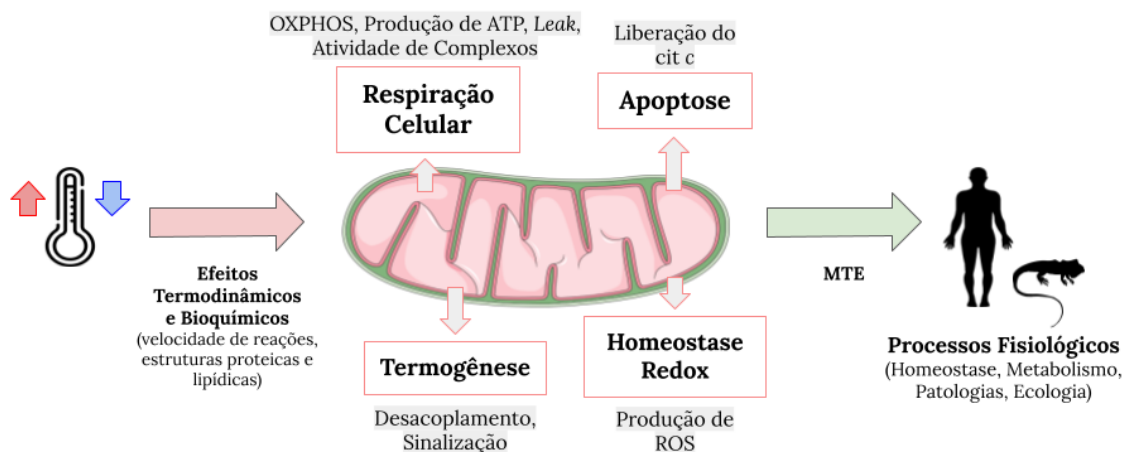


Figura 10. Como a Temperatura Pode Agir no Funcionamento Mitocondrial e Influenciar Processos Sistêmicos. A temperatura, por meio de efeitos termodinâmicos e bioquímicos, é capaz de atuar na mitocôndria. Algumas das alterações mitocondriais que são eliciadas pela temperatura permeiam as funções de Respiração Celular, Apoptose, Termogênese e Homeostase Redox. Como consequência, e indo ao encontro da MTE, as mudanças no funcionamento mitocondrial podem provocar alterações em escalas maiores, influenciando processos fisiológicos como Homeostase, Metabolismo, Patologias e Ecologia. Ícones: flaticon.com e smart.servier.com.

Um ponto fundamental a ser levantado é o quão fidedigna é a extrapolação dos efeitos mitocondriais para os sistêmicos. Para tanto, traz-se a teoria metabólica da energia como um paradigma atual promissor. Esta serve como um modelo mecanístico que propõe capturar não as interações ecológicas multi-detalhadas dos organismos, mas sim, de forma simplificada e quantitativa, "os princípios básicos dos fenômenos, os quais podem ser usados para entendimento geral de padrões empíricos e também para fazer previsões *a priori* e testáveis" (BROWN, SIBLY & KODRIC-BROWN, 2012).

As consequências da temperatura são, acima de tudo, relativas. Várias exceções aos efeitos típicos da temperatura, previstos na MTE, foram registradas.

Algumas dependências térmicas a nível celular não possuem paralelismo sistêmico, possivelmente por não contarem com os efeitos compensatórios a curto prazo ou as adaptações a longo prazo. Futuras investigações devem se voltar a compreender a fundo quais fenômenos estão por trás de tais desvios e como incorporá-los ao modelo, tornando-o mais amplo.

A princípio, a MTE não deve ser usada para além de seu intuito mecanístico: o de acrescentar poder explicativo aos dados moleculares e nortear as explicações para os efeitos a nível de organismos inteiros. Além disso, as observações celulares podem indicar correlação com eventos sistêmicos, mas inferir causalidade só é possível depois dos testes serem minuciosamente validados.

Indo ao encontro destas premissas, considera-se que eventos na escala *macro* (como a saúde e sobrevivência dos organismos) podem advir da atuação de fatores básicos, como a temperatura, sobre os eventos na escala *micro*. Portanto, é latente a necessidade de combinar as discussões sobre os possíveis impactos nestas escalas. Mas, em virtude dessa carência de estudos no âmbito *micro*, torna-se primordial entender as implicações da temperatura a nível celular, a curto e longo prazo, utilizando-se técnicas *in vitro*.

Em compensação, a exemplo de inúmeras descobertas na biologia, a chave para entender como a temperatura afeta sistematicamente a vida na Terra pode estar em *pesquisar* sob um pressuposto da ciência básica: ao buscar-se entender os efeitos subjacentes da temperatura nas escalas elementares, como a molecular e celular. Nesta perspectiva, sem necessariamente vislumbrar suas possíveis aplicações práticas, a finalidade pode consistir apenas em colaborar para o *desembaraçar* dos fenômenos da natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, D. *et al.* **Temperature-dependence of Mitochondrial Function and Production of Reactive Oxygen Species in the Intertidal Mud Clam *Mya arenaria*.** The Journal of Experimental Biology, v. 205, n. 13, p. 1831–1841, 2002.
- ADAMSON, K.; GANDY, G.; JAMES, L. **The Influence of Thermal Factors Upon Oxygen Consumption of the Newborn Human Infant.** The Journal of Pediatrics, v. 66, n. 3, p. 495-508, 1965.
- AHN, C.; METALLO, C. **Mitochondria as Biosynthetic Factories for Cancer Proliferation.** Cancer & Metabolism, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2015.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula. Cap. 14.** Artmed, 5ª ed, 2010.
- ALI, S. *et al.* **Metabolic Depression and Increased Reactive Oxygen Species Production by Isolated Mitochondria at Moderately Lower Temperatures.** Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 42, p. 32522-32528, 2010.
- ANDERSON, S. *et al.* **Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome.** Nature, v. 290, n. 5806, p. 457-465, 1981.
- ANDERSON, D; GILLOOLY, J. **Comparing the Temperature Dependence of Mitochondrial Respiration Among Vertebrates.** Evolutionary Ecology Research, v. 19, p. 659-668, 2018.
- ANDERSON-TEIXEIRA, K; SMITH, F; MORGAN ERNEST, S. **Climate Change** (Cap. 23). Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach.** SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.
- ARCHIBALD, J. **Origin of Eukaryotic Cells: 40 Years On.** Symbiosis, v. 54, n. 2, p. 69-86, 2011.
- ARCIUCH, V. *et al.* **Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 16, n. 10, p. 1150-1180, 2012.
- BELZER, F; SOUTHARD, J. **Principles of Solid-Organ Preservation by Cold Storage.** Transplantation, v. 45, n. 4, p. 673-676, 1988.
- BENNETT, A. **Thermal Dependence of Muscle Function.** American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 247, n. 2, p. R217-R229, 1984.
- BERNER, N. **Oxygen Consumption by Mitochondria From an Endotherm and an Ectotherm.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 124, n. 1, p. 25-31, 1999.
- BIOBLAST. **MitoPedia - Oroboros: Respiratory States.** Disponível em: <https://www.bioblast.at/index.php/MitoPedia:Respiratory_states>. Acesso em: 18 jan. 2021.

- BLIER, P.; LEMIEUX, H.; PICHAUD, N. **Holding Our Breath in Our Modern World: Will Mitochondria Keep the Pace With Climate Changes?**. Canadian Journal of Zoology, v. 92, n. 7, p. 591-601, 2014.
- BOGUSZEWSKA, K. *et al.* **The Similarities between Human Mitochondria and Bacteria in the Context of Structure, Genome, and Base Excision Repair System**. Molecules, v. 25, n. 12, p. 2857, 2020.
- BOYER, A; JETZ, W. **Conservation Biology** (Cap. 22). Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach**. SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.
- BOYLES, J. *et al.* **Adaptive Thermoregulation in Endotherms May Alter Responses to Climate Change**. Integrative and Comparative Biology, v. 51, n. 5, p. 676-690, 2011.
- BRAND, M.; NICHOLLS, D. **Assessing Mitochondrial Dysfunction in Cells**. Biochemical Journal, v. 435, n. 2, p. 297-312, 2011.
- BROWN, J. *et al.* **Toward a Metabolic Theory of Ecology**. Ecology, v. 85, n. 7, p. 1771-1789, 2004.
- BROWN, J; SIBLY, R; KODRIC-BROWN, A. **Introduction: Metabolism as the Basis for a Theoretical Unification of Ecology**. Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach**. SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.
- BROWN, J; SIBLY, R. **The Metabolic Theory of Ecology and its Central Equation** (Cap. 2). Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach**. SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.
- CHANCE B.; WILLIAMS G. **Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I. Kinetics of Oxygen Utilization**. Journal of Biological Chemistry, v. 217, n. 1, p. 383-393, 1955.
- CHAU-BERLINCK, J. *et al.* **Temperature Effects on Energy Metabolism: A Dynamic System Analysis**. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 269, n. 1486, p. 15-19, 2002.
- CHRISTEN, F. *et al.* **Thermal Tolerance and Thermal Sensitivity of Heart Mitochondria: Mitochondrial Integrity and ROS Production**. Free Radical Biology and Medicine, v. 116, p. 11-18, 2018.
- CLARKE, A. **Is there a Universal Temperature Dependence of metabolism?**. Functional Ecology, v. 18, n. 2, p. 252-256, 2004.
- CLARKE, A.; FRASER, K. **Why Does Metabolism Scale With Temperature?**. Functional Ecology, v. 18, n. 2, p. 243-251, 2004.
- CLARKE, A. **Temperature and the Metabolic Theory of Ecology**. Functional Ecology, v. 20, n. 2, p. 405-412, 2006.
- CLARKE, A.; PÖRTNER, H. **Temperature, Metabolic Power and the Evolution of Endothermy**. Biological Reviews, v. 85, n. 4, p. 703-727, 2010.

- COLINET, H.; RENAULT, D.; ROUSSEL, D. **Cold Acclimation Allows *Drosophila* Flies to Maintain Mitochondrial Functioning Under Cold Stress.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 80, p. 52-60, 2017.
- CORKREY, R. *et al.* **Universality of Thermodynamic Constants Governing Biological Growth Rates.** PLoS ONE, v. 7, n. 2, p. e32003, 2012.
- DAHLHOFF, E. A.; SOMERO, GEORGE N. **Effects of Temperature on Mitochondria From Abalone (genus *Haliotis*): Adaptive Plasticity and its Limits.** Journal of Experimental Biology, v. 185, n. 1, p. 151-168, 1993.
- DEDKOVA, E.; BLATTER, L. **Measuring Mitochondrial Function in Intact Cardiac Myocytes.** Journal Of Molecular And Cellular Cardiology, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2012.
- DEVINE, M.; KITTLER, J. **Mitochondria at the Neuronal Presynapse in Health and Disease.** Nature Reviews Neuroscience, v. 19, n. 2, p. 63-80, 2018.
- DUFOUR, S. *et al.* **Top-down Control Analysis of Temperature Effect on Oxidative Phosphorylation.** Biochemical Journal, v. 314, n. 3, p. 743-751, 1996.
- EBNETH, A. *et al.* **Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease.** Journal of Cell Biology, v. 143, n. 3, p. 777-794, 1998.
- ERNSTER, L.; SCHATZ, G. **Mitochondria: A Historical Review.** Journal of Cell Biology, v. 91, n. 3, p. 227s-255s, 1981.
- EVINOVA, A. *et al.* **High-Resolution Respirometry in Assessment of Mitochondrial Function in Neuroblastoma SH-SY5Y Intact Cells.** The Journal of Membrane Biology, v. 253, n. 2, p. 129-136, 2020.
- FANGUE, N.; RICHARDS, J.; SCHULTE, P. **Do Mitochondrial Properties Explain Intraspecific Variation in Thermal Tolerance?.** Journal of Experimental Biology, v. 212, n. 4, p. 514-522, 2009.
- FINSTERER, J.; ZARROUK-MAHJOUB, S. **Biomarkers for Detecting Mitochondrial Disorders.** Journal Of Clinical Medicine, v. 7, n. 2, p. 16-24, 2018.
- FOTHERGILL-GILMORE, L.; MICHELS, P. **Evolution of Glycolysis.** Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 59, n. 2, p. 105-235, 1993.
- GEORGIEVA, E. *et al.* **Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of “Free Radical Diseases”.** Anticancer Research, v. 37, n. 10, p. 5373-5381, 2017.
- GILLOOLY, J. *et al.* **Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate.** Science, v. 293, n. 5538, p. 2248-2251, 2001.
- GILLOOLY, J. *et al.* **Response to Clarke and Fraser: Effects of Temperature on Metabolic Rate.** Functional Ecology, v. 20, n. 2, p. 400-404, 2006.

- GILLOOLY, J.; MCCOY, M. **Brain Size Varies with Temperature in Vertebrates.** PeerJ, v. 2, p. e301, 2014.
- GLANCY, B. **Visualizing Mitochondrial Form and Function within the Cell.** Trends in Molecular Medicine, v. 26, n. 1, p. 58-70, 2020.
- GRAIER, W.; FRIEDEN, M.; MALLI, R. **Mitochondria and Ca²⁺ Signaling: Old Guests, New Functions.** Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, v. 455, n. 3, p. 375-396, 2007.
- GRAY, L.; TOMPKINS, S.; TAYLOR, E. **Regulation of Pyruvate Metabolism and Human Disease.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 71, n. 14, p. 2577-2604, 2013.
- GRAY, M. **Lynn Margulis and the Endosymbiont Hypothesis: 50 Years Later.** Molecular Biology of the Cell, v. 28, n. 10, p. 1285-1287, 2017.
- GREEN D.; REED, J. **Mitochondria and Apoptosis.** Science, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.
- HALSEY, L. *et al.* **The Interactions Between Temperature and Activity Levels in Driving Metabolic Rate: Theory, with Empirical Validation from Contrasting Ectotherms.** Oecologia, v. 177, n. 4, p. 1117-1129, 2015.
- HANDY, D.; LOSCALZO, J. **Redox Regulation of Mitochondrial Function.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 16, n. 11, p. 1323-1367, 2012.
- HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H.; PECK, L. **Thermal Sensitivity of Mitochondrial Function in the Antarctic Notothenioid *Lepidonotothen nudifrons*.** Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, v. 169, n. 8, p. 597-604, 1999.
- HARMS, F.; STOLKER, R.; MIK, E. **Cutaneous Respirometry as Novel Technique to Monitor Mitochondrial Function.** Plos One, v. 11, n. 9, p. e0163399, 2016.
- HECKATHORN, S.; DOWNS, C.; COLEMAN, J. **Small Heat Shock Proteins Protect Electron Transport in Chloroplasts and Mitochondria During Stress.** American Zoologist, v. 39, n. 6, p. 865-876, 1999.
- HENDRIKS, K. *et al.* **Renal Temperature Reduction Progressively Favors Mitochondrial ROS Production Over Respiration in Hypothermic Kidney Preservation.** Journal of Translational Medicine, v. 17, n. 1, 2019.
- HILTON, Z.; CLEMENTS, K.; HICKEY, A. **Temperature Sensitivity of Cardiac Mitochondria in Intertidal and Subtidal Triplefin Fishes.** Journal of Comparative Physiology B, v. 180, n. 7, p. 979-990, 2010.
- HINKLE, P. **P/O Ratios of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1706, n. 1-2, p. 1-11, 2005.
- HUTTER, E. *et al.* **High-resolution Respirometry – A Modern Tool in Aging Research.** Experimental Gerontology, v. 41, n. 1, p.103-109, 2006.

- IFTIKAR, F.; HICKEY, A. **Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus***. PLoS ONE, v. 8, n. 5, p. e64120, 2013.
- IFTIKAR, F.; MACDONALD, J.; HICKEY, A. **Thermal Limits of Portunid Crab Heart Mitochondria: Could More Thermo-stable Mitochondria Advantage Invasive Species?**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 395, n. 1-2, p. 232-239, 2010.
- JARMUSZKIEWICZ, W. *et al.* **Temperature Controls Oxidative Phosphorylation and Reactive Oxygen Species Production Through Uncoupling in Rat Skeletal Muscle Mitochondria**. Free Radical Biology and Medicine, v. 83, p. 12-20, 2015.
- JEGER, V. *et al.* **Mitochondrial Function in Sepsis**. European Journal Of Clinical Investigation, v. 43, n. 5, p. 532-542, 2013.
- JOHNSON, S.; HTWAY, Z. M.; HERNANDEZ, H. E. **Effects of Hypothermic Temperatures on Tau Hyperphosphorylation as a Model of Alzheimer's Disease in SH-SY5Y Cells**. American International Journal of Biology, v. 6, n. 1, p. 32-38, 2018.
- JOHNSTON, I. *et al.* **Are Mitochondria Subject to Evolutionary Temperature Adaptation?**. Journal of Experimental Biology, v. 195, n. 1, p. 293-306, 1994.
- JORJANI, P.; OZTURK, S. **Effects of Cell Density and Temperature on Oxygen Consumption Rate for Different Mammalian Cell Lines**. Biotechnology and Bioengineering, v. 64, n. 3, p. 349-356, 1999.
- KIBERSTIS, P. **Mitochondria Make a Comeback**. Science, v. 283, p. 1475. 1999.
- KOOLMAN, J.; ROHM, K. **Color Atlas of Biochemistry. Metabolism, Nutrition**. 2. ed. Stuttgart: Thieme, 2004.
- KREBS, H.; JOHNSON, W. **Metabolism of Ketonic Acids in Animal Tissues**. Biochemical Journal, v. 31, n. 4, p. 645-660, 1937.
- KUMAR, A. *et al.* **TRPV4 Interacts with Mitochondrial Proteins and Acts as a Mitochondrial Structure-function Regulator**. bioRxiv, 330993, 2018.
- KUZNETSOV, A. *et al.* **Analysis of Mitochondrial Function in situ in Permeabilized Muscle Fibers, Tissues and Cells**. Nature Protocols, v. 3, n. 6, p. 965-976, 2008.
- KUZNETSOV, A.; MARGREITER, R. **Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity**. International Journal of Molecular Sciences, v. 10, n. 4, p. 1911-1929, 2009.
- LANE, N. **Mitochondria: Key to Complexity**. Em: **Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes**. MARTIN, W., MÜLLER, M (eds). Springer, p. 13-38, 2007.
- LANIER, W. **Cerebral Metabolic Rate and Hypothermia: Their Relationship With Ischemic Neurologic Injury**. Journal of Neurosurgical Anesthesiology, v. 7, n. 3, p. 216-221, 1995.

- LANZA, I.; NAIR, K. **Mitochondrial Metabolic Function Assessed *in vivo* and *in vitro*.** Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2010.
- LEE, J. *et al.* **The Role of Adipose Tissue Mitochondria: regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases.** International Journal Of Molecular Sciences, v. 20, n. 19, p. 4924-4946, 2019.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Principios de Bioquímica de Lehninger.** Cap. 14, 16, 17, 19. Armed, 6. ed., 2014 (figuras) e W. H. Freeman and Company, 7. ed., 2017.
- LEMIEUX, H.; TARDIF, J.; BLIER, P. **Thermal Sensitivity of Oxidative Phosphorylation in Rat Heart Mitochondria: Does Pyruvate Dehydrogenase Dictate the Response to Temperature?.** Journal of Thermal Biology, v. 35, n. 2, p. 105-111, 2010.
- LEPOCK, J. *et al.* **Hyperthermia-induced Inhibition of Respiration and Mitochondrial Protein Denaturation in CHL Cells.** International Journal of Hyperthermia, v. 3, n. 2, p. 123-132, 1987.
- MA, S. *et al.* **Activation of the Cold-sensing TRPM8 Channel Triggers UCP1-dependent Thermogenesis and Prevents Obesity.** Journal of Molecular Cell Biology, v. 4, n. 2, p. 88-96, 2012.
- MACEY, J. *et al.* **Evidence of Two Deeply Divergent Co-existing Mitochondrial Genomes in the Tuatara Reveals an Extremely Complex Genomic Organization.** Communications Biology, v. 4, n. 1, 2021.
- MAYEVSKY, A.; ROGATSKY, G. **Mitochondrial Function *in vivo* Evaluated by NADH Fluorescence: From Animal Models to Human Studies.** American Journal of Physiology - Cell Physiology, v. 292, n. 2, p. 615-640, 2007.
- MERLO-PICH, M. *et al.* **Methods to Detect Mitochondrial Function.** Experimental Gerontology, v. 39, n. 3, p. 277-281, 2004.
- MICHENFELDER, J.; MILDE, J. **The Effect of Profound Levels of Hypothermia (Below 14°C) on Canine Cerebral Metabolism.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, v. 12, n. 5, p. 877-880, 1992.
- MISHRA, P.; CHAN, D. **Mitochondrial Dynamics and Inheritance During Cell Division, Development and Disease.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 10, p. 634-646, 2014.
- MOELLERING, D.; SMITH, D. **Ambient Temperature and Obesity.** Current Obesity Reports, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2012.
- MORELLI, A. *et al.* **An Update of the Chemiosmotic Theory as Suggested by Possible Proton Currents Inside the Coupling Membrane.** Open Biology, v. 9, n. 4, p. 180221, 2019.
- MUNDIM, K. *et al.* **Temperature Coefficient (Q₁₀) and its Applications in Biological Systems: Beyond the Arrhenius Theory.** Ecological Modelling, v. 431, p. 109127, 2020.

- NEWELL, R.; WALKEY, M. **Oxidative Activity of Mammalian Liver Mitochondria as a Function of Temperature.** *Nature*, v. 212, n. 5060, p. 428-429, 1966.
- O'CONNOR, M. *et al.* **Reconsidering the Mechanistic Basis of the Metabolic Theory of Ecology.** *Oikos*, v. 116, n. 6, p. 1058-1072, 2007.
- O'CONNOR, M.; BRUNO, J. **Marine Invertebrates** (Cap. 15). Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach.** SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.
- OSWALD, S.; ARNOLD, J. **Direct Impacts of Climatic Warming on Heat Stress in Endothermic Species: Seabirds as Bioindicators of Changing Thermoregulatory Constraints.** *Integrative Zoology*, v. 7, n. 2, p. 121-136, 2012.
- PAGLIARINI, D.; RUTTER, J. **Hallmarks of a New Era in Mitochondrial Biochemistry.** *Genes & Development*, v. 27, n. 24, p. 2615-2627, 2013.
- PAITAL, B.; CHAINY, G. **Effects of Temperature on Complexes I and II Mediated Respiration, ROS Generation and Oxidative Stress Status in Isolated Gill Mitochondria of the Mud Crab *Scylla serrata*.** *Journal of Thermal Biology*, v. 41, p. 104-111, 2014.
- PALLEN, M. **Time to Recognise That Mitochondria Are Bacteria?.** *Trends in Microbiology*, v. 19, n. 2, p. 58-64, 2011.
- PAMENTER, M.; LAU, G.; RICHARDS, J. **Effects of Cold on Murine Brain Mitochondrial Function.** *PLOS ONE*, v. 13, n. 12, p. e0208453, 2018.
- PEDERSEN, S.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. **TRP channels: An overview.** *Cell Calcium*, v. 38, n. 3-4, p. 233-252, 2005.
- PÉREZ, M.; JARA, C.; QUINTANILLA, R. **Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration.** *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, 2018.
- PERRY, C. *et al.* **Methods for Assessing Mitochondrial Function in Diabetes.** *Diabetes*, v. 62, n. 4, p. 1041-1053, 2013.
- POLYMEROPOULOS, E.; OELKRUG, R.; JASTROCH, M. **Mitochondrial Proton Leak Compensates for Reduced Oxidative Power during Frequent Hypothermic Events in a Protoendothermic Mammal, *Echinops telfairi*.** *Frontiers in Physiology*, v. 8, 2017.
- PÖRTNER, H.; KNUST, R. **Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance.** *Science*, v. 315, n. 5808, p. 95-97, 2007.
- POWER, A. *et al.* **Uncoupling of Oxidative Phosphorylation and ATP Synthase Reversal Within the Hyperthermic Heart.** *Physiological Reports*, v. 2, n. 9, p. e12138, 2014.
- PRICE, C. *et al.* **Testing the Metabolic Theory of Ecology.** *Ecology Letters*, v. 15, n. 12, p. 1465-1474, 2012.

RANGO, M. *et al.* **The Brain is Hypothermic in Patients with Mitochondrial Diseases.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, v. 34, n. 5, p. 915-920, 2014.

REYES, B.; PENDERGAST, J.; YAMAZAKI, S. **Mammalian Peripheral Circadian Oscillators Are Temperature Compensated.** Journal of Biological Rhythms, v. 23, n. 1, p. 95-98, 2008.

RICH, P. **A Perspective on Peter Mitchell and the Chemiosmotic Theory.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 40, n. 5, p. 407-410, 2008.

ROTTENBERG, H. **Phase Transitions and Coupling in Energy Transducing Membranes.** FEBS Letters, v. 94, n. 2, p. 295-297, 1978.

ROUSSEL, D.; VOITURON, Y. **Mitochondrial Costs of Being Hot: Effects of Acute Thermal Change on Liver Bioenergetics in Toads (*Bufo bufo*).** Frontiers in Physiology, v. 11, 2020.

RUSTIN, P. **Mitochondria, from Cell Death to Proliferation.** Nature Genetics, v. 30, n. 4, p. 352-353, 2002.

SALIN, K. *et al.* **Variation in the Link Between Oxygen Consumption and ATP Production, and its Relevance for Animal Performance.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 282, n. 1812, p. 20151028, 2015.

SCHEFFLER, I. **Mitochondria.** Cap. 1. 2. ed. Willey, 2008.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. **ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress.** Current Biology, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SCHULTE, P. **The Effects of Temperature on Aerobic Metabolism: Towards a Mechanistic Understanding of the Responses of Ectotherms to a Changing Environment.** Journal of Experimental Biology, v. 218, n. 12, p. 1856-1866, 2015.

SENA, L.; CHANDEL, N. **Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species.** Molecular Cell, v. 48, n. 2, p. 158-167, 2012.

SETCHELL, B. **The Effects of Heat on the Testes of Mammals.** Animal Reproduction, v. 3, n. 2, p. 81-91. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2018.

SOMERO, G. **Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits, and Costs of Living.** Integrative and Comparative Biology, v. 42, n. 4, p. 780-789, 2002.

SPINELLI, J.; HAIGIS, M. **The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism.** Nature Cell Biology, v. 20, n. 7, p. 745-754, 2018.

STORCH, D. **Biodiversity and its Energetic and Thermal Controls** (Cap. 11). Em: **Metabolic Ecology: A Scaling Approach.** SIBLY, R.; BROWN, J.; KODRIC-BROWN, A. (Eds.). John Wiley & Sons, 2012.

TATTERSALL, G. *et al.* **Coping with Thermal Challenges: Physiological Adaptations to Environmental Temperatures.** Comprehensive Physiology, v. 2, n. 3, p. 2151-2202, 2012.

TEULIER, L. *et al.* **Cold-acclimation-induced Non-shivering Thermogenesis in Birds is Associated With Upregulation of Avian UCP but not With Innate Uncoupling or Altered ATP Efficiency.** Journal of Experimental Biology, v. 213, n. 14, p. 2476-2482, 2010.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1953. **NobelPrize.org.** Nobel Media AB 2020. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1953/summary/>>. Acesso em 3 Dez 2020.

TISSIER, R. *et al.* **Mild Hypothermia Reduces Per-ischemic Reactive Oxygen Species Production and Preserves Mitochondrial Respiratory Complexes.** Resuscitation, v. 84, n. 2, p. 249-255, 2013.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria (Cellular Organelles).** Cap. 1. Plenum Pr, 1982.

VANDER-HEIDEN, M.; CANTLEY, L.; THOMPSON, C. **Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.** Science, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VERTREES, R. *et al.* **Whole-body Hyperthermia: A Review of Theory, Design and Application.** Perfusion, v. 17, n. 4, p. 279-290, 2002.

VOET, D.; VOET J. **Bioquímica.** Cap. 17, 21, 22. 4. ed. Artmed, 2011.

WHITE, C.; PHILLIPS, N.; SEYMOUR, R. **The Scaling and Temperature Dependence of Vertebrate Metabolism.** Biology Letters, v. 2, n. 1, p. 125-127, 2005.

WHITE, M. *et al.* **Mitochondrial Dysfunction Induced by Heat Stress in Cultured Rat CNS Neurons.** Journal of Neurophysiology, v. 108, n. 8, p. 2203-2214, 2012.

WILLIAMS, J. *et al.* **New Methods for Monitoring Mitochondrial Biogenesis and Mitophagy in vitro and in vivo.** Experimental Biology and Medicine, v. 242, n. 8, p. 781-787, 2017.

XIAO, Y. **Modelling Temperature-dependency in Biology by Generalizing Temperature Coefficient Q₁₀.** Ecological Modelling, v. 127, n. 2-3, p. 283-290, 2000.

YANG, L. *et al.* **Effects of Acute Heat Stress and Subsequent Stress Removal on Function of Hepatic Mitochondrial Respiration, ROS Production and Lipid Peroxidation in Broiler Chickens.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 151, n. 2, p. 204-208, 2010.

ZOROVA, L. *et al.* **Mitochondrial Membrane Potential.** Analytical Biochemistry, v. 552, p. 50-59, 2018.

ZUKIENE, R. *et al.* **Acute Temperature Resistance Threshold in Heart Mitochondria: Febrile Temperature Activates Function but Exceeding it Collapses the Membrane Barrier.** International Journal of Hyperthermia, v. 26, n. 1, p. 56-66, 2010.

APÊNDICE

Apêndice 1. Bibliografia Anotada.

https://docs.google.com/document/d/11c9h_QWuVZpJH2LnIRi4ojInii0kAMWsZAdpKcfCMeM/edit?usp=sharing