THIAGO SIMÕES MACHADO

**Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo
para o estudo da herança de doenças mitocondriais**

São Paulo

2014

THIAGO SIMÕES MACHADO

**Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo
para o estudo da herança de doenças mitocondriais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

De acordo:

Orientador

São Paulo
2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3019
FMVZ

Machado, Thiago Simões
Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança
de doenças mitocondriais / Thiago Simões Machado. -- 2014.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti.

1. Embrião. 2. CMXRos. 3. DNA mitocondrial. 4. Mitocôndria. 5. Herança citoplasmática. I. Título.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA		
Comissão de Ética no Uso de Animais		
 CERTIFICADO 		
Certificamos que o Projeto intitulado "Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança de doenças mitocondriais", protocolado sob o nº 2563/2012, utilizando 50 (cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Dr. Marcos Roberto Chiaratti (Pós-Doutorando da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.		
We certify that the Research "Transplantation of cytoplasm subjected to oxidative stress as a model for study of mitochondrial disease inheritance", protocol number 2563/2012, utilizing 50 (fifty) mice, under the responsibility Dr. Marcos Roberto Chiaratti (Pós-Doutorando da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.		
São Paulo, 16 de dezembro de 2013.		
 Denise Tabacchi Fantoni Presidente		
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP – Brasil 05508-270		Fone: + 55 11 3091-7571/7576/0904 Fax: +55 11 3032-2224 E-mail: ceuavet@usp.br http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACHADO, Thiago Simões

Titulo: Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança de doenças mitocondriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

---

*A Deus, por ter me concedido a
oportunidade, saúde, força e inspiração para
concluir esta etapa da minha vida.*

*Aos meus queridos pais e irmãos,
que sempre estiveram ao meu lado me dando
todo o suporte em cada momento, assim como
agradeço à toda família estendida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP pela bolsa fornecida durante todo este período, que foi essencial para desenvolvimento desta dissertação. Também à CAPES que me auxiliou no início do mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti que teve a paciência, disposição e cuidado de me orientar a cada passo, ajudando-me a crescer profissionalmente, dando um exemplo de vida profissional e pessoal. Agradeço toda atenção e amizade desenvolvida durante todo este processo o que proporcionou aprendizados e experiências que se estendem além do projeto de mestrado.

Aos meus amigos e companheiros de equipe de trabalho Carolina Habermann Macabelli e Thiago Bittencourt Rodrigues que estiveram comigo a cada passo, me ajudando com os experimentos, dando sugestões, oferecendo amizade enquanto passamos juntos por etapas semelhantes da vida. Estendo meus agradecimentos à Maite del Collado e ao Juliano Rodrigues Sangalli que também sempre estiveram dispostos a me ajudar nas minhas pesquisas, dispondo do tempo deles para desenvolver a pesquisa. Agradeço a atenção, carinho e amizade de cada um.

À Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob Coordenação da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, oferecendo os recursos e estrutura viabilizando a realização da pesquisa do início ao fim.

Aos meus companheiros de laboratório, alunos estagiários e de pós graduação, técnicos, seguranças e equipe da limpeza, aos meus inúmeros amigos e familiares que me apoiaram direta ou indiretamente durante todo este período.

“Quando o homem compreende a sua realidade, pode levantar hipóteses sobre o desafio dessa realidade e procurar soluções. Assim, pode transformá-la e o seu trabalho pode criar um mundo próprio, seu Eu e as suas circunstâncias.”

Paulo Freire

RESUMO

MACHADO, T. S. **Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança de doenças mitocondriais.** [Transplantation of cytoplasm subjected to oxidative stress as a model for study of mitochondrial disease inheritance]. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Patologias causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) constituem um importante grupo de doenças genéticas em humanos. Todavia, devido ao desconhecimento dos mecanismos que governam a herança mitocondrial, não existem métodos eficientes que permitam prever ou intervir na herança destas patologias. Estudos recentes indicam que mutações no mtDNA são seletivamente eliminadas na linhagem germinativa. O presente projeto investigou se o embrião é capaz de eliminar mitocôndrias disfuncionais durante o desenvolvimento pré-implantação. Para tanto, zigotos de camundongo foram tratados com clorometil-X-rosamina (MitoTracker Red CMXRos) e fotossensibilizados por 0, 2,5, 5, 10, 20 e 60 s. Houve diminuição da taxa de blastocisto, com bloqueio total do desenvolvimento quando a fotossensibilização foi realizada por período igual ou superior a 20 s. A fotossensibilização também resultou em disfunção mitocondrial, como indicado por diminuição do potencial de membrana mitocondrial. No entanto, a transferência de citoplasma de zigotos NZB/BINJ (NZB) fotossensibilizados por 20 s não afetou o desenvolvimento de embriões C57BL/6 (B6). A quantidade de mtDNA NZB também não diferiu entre os zigotos B6, independente de terem recebido citoplasma exposto ou não à fotossensibilização ($30,6\% \pm 1,73$ vs. $30,8\% \pm 1,73$). Porém, a quantidade de mtDNA NZB foi menor ($P = 0,008$) nos blastocistos que receberam citoplasma fotossensibilizado ($31,4\% \pm 1,43$ vs. $24,7\% \pm 1,43$). Como a quantidade total de mtDNA não diferiu entre os grupos, estes resultados sugerem que as mitocôndrias disfuncionais introduzidas foram destruídas. A análise de autofagossomos indicou, no entanto, que as mitocôndrias NZB não foram eliminadas por mitofagia. Diferente do esperado, o cultivo na presença de rapamicina reverteu o efeito causado pela introdução de citoplasma fotossensibilizado, resultando em níveis semelhantes de mtDNA NZB em comparação com os blastocistos que receberam citoplasma não fotossensibilizado. Concluiu-se que o embrião de camundongo é capaz de destruir mitocôndrias disfuncionais durante o desenvolvimento à blastocisto. Novos estudos deverão fornecer evidências adicionais e esclarecer os mecanismos moleculares que fundamentam esses achados.

Palavras-chave: Embrião. CMXRos. DNA mitocondrial. Mitocôndria. Herança citoplasmática.

ABSTRACT

MACHADO, T. S. **Transplantation of cytoplasm subjected to oxidative stress as a model for study of mitochondrial disease inheritance.** [Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança de doenças mitocondriais]. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pathologies caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) represent an important group of genetic diseases in humans. Nonetheless, due to our limited understanding of the molecular mechanisms of mitochondrial inheritance there are no efficient methods to predict or intervene in the inheritance of these diseases. Recent studies indicate that mutations in mtDNA are selectively eliminated in the germline. This project investigated the ability of the embryo to target and eliminate dysfunctional mitochondria during early development. To test that, mouse zygotes were treated with chloromethyl-X-rosamina (MitoTracker Red CMXRos) and photosensitized for 0, 2.5, 5, 10, 20 and 60 s. There was a decrease in the rate of blastocyst development and a developmental arrest when the photosensitization was performed for a period equal to or greater than 20 s. Photosensitization also resulted in mitochondrial dysfunction, as indicated by a decreased of mitochondrial membrane potential. However, cytoplasmic transfer from NZB/BINJ (NZB) zygotes photosensitized for 20 s resulted in no effect on development of C57BL/6 (B6) embryos. The amount of NZB mtDNA introduced also did not differ between B6 zygotes, regardless of whether they received or not photosensitized cytoplasm ($30.6\% \pm 1.73$ vs. $30.8 \pm 1.73\%$). On the other hand, the amount of NZB mtDNA was lower ($P = 0.008$) in the blastocysts receiving photosensitized cytoplasm ($31.4\% \pm 24.7\% \pm 1.43$ vs. 1.43). Since the total amount of mtDNA was not different between the groups, these results suggest that dysfunctional mitochondria introduced by cytoplasmic transfer were destroyed. Analysis of autophagosomes indicated, however, that the NZB mitochondria were not eliminated by mitophagy. Different than expected, culture in the presence of rapamycin reversed the effect caused by introduction of photosensitized cytoplasm, resulting in similar levels of NZB mtDNA compared to blastocysts receiving cytoplasm not photosensitized. It was concluded that the mouse embryo may destroy dysfunctional mitochondria during development into blastocysts. Further studies should provide additional evidence and elucidate the molecular mechanisms underlying these findings.

Keywords: Embryo. CMXRos. Mitochondrial DNA. Mitochondria. Cytoplasmic inheritance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A MITOCÔNDRIA	18
2.2	O GENOMA MITOCONDRIAL.....	20
2.3	HERANÇA MITOCONDRIAL.....	23
2.4	DOENÇAS MITOCONDRIAS.....	26
2.5	HERANÇA DE DOENÇAS MITOCONDRIAS	27
2.6	CONTROLE DE QUALIDADE MITOCONDRIAL	30
2.7	FOTOSENSIBILIZAÇÃO MITOCONDRIAL	33
3	HIPÓTESES	36
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS	40
5.2	COLETA E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	41
5.3	DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE FOTOSENSIBILIZAÇÃO	41
5.4	ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DISTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL.....	42
5.5	TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA	43
5.6	LISE DOS EMBRIÕES	44
5.7	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BIÓPSIA DA CAUDA DE CAMUNDONGOS	44
5.8	ANÁLISE DA HETEROPLASMIA MITOCONDRIAL.....	45
5.9	QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA.....	45
5.10	ANÁLISE DE HETEROPLASMIA E DE AUTOFAGOSSOMOS DOS EMBRIÕES TRATADOS COM RAPAMICINA	46
5.11	ANÁLISE DOS DADOS	47
6	RESULTADOS	49

6.1	ENSAIO PARA ANÁLISE DE NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA E HETEROPLASMIA MITOCONDRIAL.....	49
6.2	A FOTOSSENSIBILIZAÇÃO RESULTA EM BLOQUEIO DO DESENVOLVIMENTO À BLASTOCISTO E DIMINUIÇÃO DO $\Delta\psi_M$	54
6.3	A INTRODUÇÃO DE CITOPLASMA FOTOSSENSIBILIZADO NÃO AFETA O DESENVOLVIMENTO À BLASTOCISTO	60
6.4	A QUANTIDADE DE MTDNA NZB INTRODUZIDO POR TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA DIMINUI NOS BLASTOCISTOS QUE RECEBEM CITOPLASMA FOTOSSENSIBILIZADO	61
6.5	A REDUÇÃO DA HETEROPLASMIA NOS BLASTOCISTOS NÃO É CAUSADA POR ELIMINAÇÃO AUTOFÁGICA DAS MITOCÔNDRIAS INTRODUZIDAS.....	66
7.	DISCUSSÃO	72
8	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

Disfunções mitocondriais causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) representam um importante grupo de patologias humanas em que a severidade varia de médio a letal (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; LARSSON, 2010; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Estudos epidemiológicos de mutações no mtDNA em adultos têm mostrado uma prevalência mínima de aproximadamente 1 para 5.000, o que coloca as doenças mitocondriais entre as desordens genéticas mais comuns (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). As doenças mitocondriais são representadas por mutações pontuais e rearranjos de mtDNA (deleção, duplicação ou inversão) que comprometem diretamente a função mitocondrial (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Desde 1988, mais de 270 mutações pontuais no mtDNA já foram descritas em humanos e, estão associadas a patologias de herança exclusivamente materna, natureza progressiva e com efeitos devastantes (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Posto que não há ainda tratamento eficaz para estas patologias, grande enfoque tem sido dado à prevenção da sua transmissão para as gerações seguintes. No entanto, não é possível prever com acurácia o risco de uma mulher acometida por uma mutação no mtDNA transmitir a patologia para seus descendentes. Isto se deve, em parte, ao desconhecimento dos mecanismos moleculares que controlam a herança mitocondrial (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010).

Estudos recentes têm indicado que o mtDNA é seletivamente eliminado na linhagem germinativa feminina nos casos em que este é portador de mutação com grave efeito sobre a função da organela (FAN et al., 2008; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008a). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são conhecidos, mas diversas evidências apontam para a eliminação do mtDNA mutante com base no seu efeito sobre a função da organela (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; NARENDRA et al., 2010; STEWART et al., 2008b; TWIG et al., 2008). Em células somáticas, eventos seguidos de fusão e fissão mitocondrial resultam na segregação dos mtDNAs mutantes e selvagens (SCARFFE et al., 2014; TANAKA et al., 2010; TWIG et al., 2008). Quando a porcentagem de moléculas mutantes numa mesma mitocôndria é elevada, resultando em disfunção da organela, a célula é capaz de identificar e eliminar essas mitocôndrias por autofagia (e.g.

mitofagia), com consequente destruição das moléculas mutantes (TWIG; SHIRIHAI, 2011). De forma análoga, mitocôndrias paternas introduzidas pelo espermatozoide no oócito durante a fecundação são rapidamente eliminadas por autofagia durante os primeiros estádios do desenvolvimento (AL RAWI et al., 2011; SUTOVSKY et al., 1999). Tal mecanismo de autofagia poderia, portanto, também estar envolvido na eliminação no embrião de mtDNA mutantes herdados da mãe.

Neste trabalho, investigamos a capacidade do embrião de camundongo de eliminar mitocôndrias disfuncionais durante o desenvolvimento embrionário inicial. Para tanto, zigotos portadores de mtDNA da linhagem NZB/BINJ foram fotossensibilizados com clorometil-X-rosamina (CMXRos; MitoTracker Red CMXRos) e parte do citoplasma introduzido em zigotos portadores de mtDNA da linhagem C57BL/6. Uma vez que a fotossensibilização resulta em disfunção da mitocôndria, esperava-se que o embrião receptor de citoplasma fosse capaz de eliminar as mitocôndrias introduzidas, resultando na redução dos níveis do mtDNA NZB/BINJ durante o desenvolvimento pré-implantação. O presente projeto deve contribuir para o conhecimento das bases moleculares que regem a herança mitocondrial, o que tem implicação para a prevenção e intervenção sobre a herança de severas patologias humanas causadas por mutações no mtDNA.

REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A MITOCÔNDRIA

A mitocôndria, organela presente no citoplasma das células eucarióticas, está envolvida em uma série de processos essenciais como apoptose, homeostase de cálcio e degradação de ácidos graxos, mas a sua mais importante tarefa é a geração de adenosina trifosfato (ATP) (ALBERTS et al., 2010). Na maioria dos procariotos o ATP é produzido exclusivamente por vias (e.g. glicólise) que extraem somente parte da energia armazenada em substratos energéticas como carboidratos. Assim, o estabelecimento na célula de uma organela especializada na síntese de ATP, que realiza a oxidação completa de substratos, é considerado evento chave para a evolução das espécies, possibilitando o surgimento de organismos altamente complexos como os mamíferos. De acordo com a teoria endossimbiótica, a mitocôndria surgiu a partir da simbiose de um organismo procarioto (possivelmente uma α -protopbactéria do gênero *Rickettsia*) com um organismo pré-eucariótico, provavelmente um *Archae* anaeróbico (JANSEN, 2000). Esta simbiose além de possibilitar um significativo ganho na eficiência de geração de energia, também possibilitou que a célula hospedeira se protegesse do estresse oxidativo gerado pelo aumento crescente das concentrações de oxigênio (O_2) na atmosfera. Diversas evidências atestam a origem endossimbiótica da mitocôndria (e.g., presença de dupla membrana, sensibilidade a antibióticos, etc), mas a mais importante destas é a presença de um genoma próprio, o DNA mitocondrial (mtDNA) (ALBERTS et al., 2010; NASS; NASS 1963a; NASS; NASS, 1963b).

A síntese de ATP na mitocôndria é realizada por um processo conhecido como fosforilação oxidativa (OXPHOS) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Por meio deste processo, elétrons oriundos da oxidação de substratos energéticos (carboidratos, lipídios e aminoácidos) são carregados por quatro complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) localizados na membrana mitocondrial interna. A energia derivada do fluxo de elétrons por estes complexos é utilizada para armazenar prótons (H^+) oriundos da matriz mitocondrial no espaço inter-membranas. O gradiente de H^+ na mitocôndria gera um potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), o qual pode ser convertido em ATP pelo retorno regulado dos H^+ para a matriz. Este evento, esquematizado na Figura 1, é controlado por um quinto complexo enzimático (complexo V ou ATP sintase) também localizado na membrana mitocondrial

interna que converte a energia gerada pelo retorno dos H^+ para a matriz em ATP (ALBERTS et al., 2010; LEHNINGER; NELSON; COX, 2005).

Os cinco complexos enzimáticos responsáveis pela cadeia transportadora de elétrons são constituídos por mais de 80 proteínas distintas, das quais 13 são codificadas na mitocôndria pelo mtDNA enquanto as demais são codificadas no núcleo pelo DNA nuclear (nDNA) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Todas as proteínas mitocondriais codificadas no núcleo são traduzidas no citoplasma e importadas pela mitocôndria. A codificação conjunta de proteínas por dois genomas distintos deveu-se a transferência durante a evolução de quase a totalidade dos genes mitocondriais para o núcleo (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007). Além da grande maioria dos genes que codificam proteínas envolvidas na função mitocondrial, também foram transferidos genes que codificam proteínas de replicação, transcrição e tradução do mtDNA, tornando a função mitocondrial dependente do núcleo (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007). A permanência de pouco mais do que uma dezena de genes na mitocôndria é explicada por três diferentes teorias que se complementam: i) a manutenção de genes na mitocôndria seria importante para um controle mais refinado do metabolismo mitocondrial; ii) os genes não transferidos codificam proteínas altamente hidrofóbicas que não poderiam ser importadas e corretamente posicionadas na organela; e, iii) diferenças nos códigos de síntese proteica entre o mtDNA e o nDNA teriam limitado a transferência gênica (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007). Independente do motivo, a manutenção de um genoma próprio e sua expressão em níveis adequados é essencial para a função mitocondrial, principalmente para a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, síntese de ATP (LARSSON, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Figura 1 - Complexos envolvidos na Fosforilação Oxidativa

Fonte: Adaptado de Schon; Dimauro; Hirano (2012).

Legenda: A figura demonstra os complexos: I (NADH-coenzima Q oxidoreductase), II (Succinato-Q oxidoreductase), III (Q-citocromo *c* oxidoreductase), IV (Citocromo *c* oxidase) e complexo V ou ATP sintase (dividido nas regiões F_0 e F_1). Também se encontram dois carreadores de elétrons. Há um fluxo de elétrons que passa por cada complexo com auxílio dos carreadores Ubiquinona ou Coenzima Q (CoQ) e citocromo *c* (Cyt *c*). Assim, a via metabólica consegue produzir trifosfato de adenosina (ATP) a medida que a adenosina difosfato (ADP) é fosforilada no complexo V. Esse último complexo age de acordo com o gradiente de prótons obtido durante a OXPHOS, no qual os prótons se dirigem à matriz mitocondrial gerando uma força motriz no complexo V resultando na fosforilação. Os Complexos I, III, IV e V são codificados tanto no DNA nuclear (nDNA), cujos polipeptídeos estão em azul (exceto o DHOD que está em rosa), quanto no mtDNA, cujos polipeptídeos são representados por diversas cores, representando diferentes genes do mtDNA. Já o complexo II compreende subunidades codificadas exclusivamente pelo nDNA. IMS = espaço inter-membranas; MIM = membrana mitocondrial interna.

2.2 O GENOMA MITOCONDRIAL

O mtDNA dos mamíferos possui formato circular contendo duas fitas, uma chamada de fita leve (mais interna) e outra de fita pesada (mais externa) pois diferem entre si por apresentarem distintas densidades em gradiente de cloreto de cério (Figura 2) (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007). Tal característica é devido a fita pesada ser mais rica em guaninas, em relação à fita oposta. Nos mamíferos, o mtDNA contém somente cerca de 16.500 pares de bases (podendo variar de 6.000 a 300.000 pares de bases em outras espécies), responsáveis pela codificação de 13 RNAs mensageiros (mRNAs), que

de mutação conhecidos por causarem diferentes patologias, como MELAS, MERRF, LHON e outras.

O mtDNA é uma molécula extremamente compacta, já que não possui íntrons e regiões intergênicas são inexistentes ou limitadas a poucos nucleotídeos. A única região não codificadora é a D-loop onde proteínas codificadas pelo núcleo interagem com o mtDNA para controlar sua transcrição e replicação (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; SHADEL; CLAYTON, 1997; TAANMAN, 1999). Além disso, alguns dos genes codificantes de mRNAs se sobrepõem, parte dos códons de terminação são gerados pós-transcricionalmente por poli-adenilação dos mRNAs e os genes de rRNAs e tRNAs são excepcionalmente compactos. Tais características tornam o mtDNA bastante susceptível a mutações que possam interferir na síntese proteica (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; WALLACE, 2005). Ademais, a mitocôndria constitui o principal sítio de formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) na célula (WALLACE, 2005), e mesmo com a existência de mecanismos de proteção, como as enzimas superóxido-dismutase e glutatona-peroxidase, o mtDNA é mais susceptível a lesões causadas por EROS do que o nDNA (ALBERTS et al., 2010; LARSSON, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; WALLACE, 2005). EROS são geradas na mitocôndria como resultado da redução incompleta do O_2 a H_2O . Os principais tipos de EROS gerados na mitocôndria são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas são altamente reativas e, devido à proximidade ao mtDNA, podem reagir com as bases nitrogenadas ou as desoxirriboses, resultando em inúmeras alterações na sua estrutura. Se não reparadas, essas alterações podem ser convertidas a mutações e até mesmo alterar a sequência de aminoácidos de proteínas codificadas pelo mtDNA (EKERT, 1962; FOOTE, 1968; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; HARMAN, 2002; KOWALTOWSKI et al., 2009; OGILBY, 2010).

Diferente do nDNA, existem centenas a milhares de cópias de mtDNA em cada célula e o genoma mitocondrial é continuamente renovado e replicado ao longo do ciclo celular (LARSSON, 2010). Portanto, embora a replicação do mtDNA esteja sobre o controle do núcleo ela não ocorre num momento específico do ciclo celular e pode sofrer influência do metabolismo e do tipo celular (CHIARATTI et al., 2011). Dessa forma, células de tecidos com elevada exigência energética como as do tecido nervoso, muscular e hepático contêm muito mais cópias do que células de tecidos com menor exigência (MAY-PANLOUP et al., 2007). A existência de múltiplas cópias, até mesmo dentro de uma mesma organela, minimiza o efeito de mutações sobre a função mitocondrial. Este fenômeno conhecido por

complementação mitocondrial possibilita que moléculas selvagens codifiquem proteínas normais que compensam o defeito causado por moléculas mutantes (LARSSON, 2010; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). A complementação mitocondrial é favorecida pela ocorrência constante de fissão e fusão mitocondrial que possibilita a troca de mtDNAs, RNAs e proteínas entre mitocôndrias (BUSCH; KOWALD; SPELBRINK, 2014; TWIG; SHIRIHAI, 2011; VRIES et al., 2012). No entanto, isso somente é possível quando moléculas mutantes e selvagens coexistem numa célula (heteroplasmia), não sendo possível nos casos de homoplasmia (e.g., presença somente de moléculas mutantes). Além disso, quando a porcentagem de moléculas mutantes ultrapassa um limiar específico, a complementação é incapaz de impedir o dano sobre a função mitocondrial, resultando na manifestação de sérias patologias. Esse limiar é diferente dependendo da localização da mutação no mtDNA e do tipo celular, variando de 50% a 90% nos casos de deleção e acima de 90% para mutações em tRNAs (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; LARSSON, 2010; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; WALLACE, 2005).

2.3 Herança mitocondrial

A herança mitocondrial em mamíferos é exclusivamente materna uma vez que o óvulo contribui com uma quantidade cerca de mil vezes maior de mtDNA que o espermatozoide (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Além disso, as mitocôndrias paternas são marcadas com ubiquitina e destruídas poucas horas após a fecundação (AL RAWI et al., 2011; SUTOVSKY et al., 1999). No entanto, mesmo com a eliminação das mitocôndrias paternas, mutações patogênicas no mtDNA estão presentes em cerca de uma pessoa a cada 200 devido, entre outros fatores, à susceptibilidade aumentada do mtDNA a ocorrência de mutações (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Em tecidos somáticos a heteroplasmia pode variar ao longo do tempo e entre diferentes tecidos. Isso é possível uma vez que nenhum mecanismo assegura a replicação de todas as moléculas de mtDNA uma única vez por ciclo celular e as mitocôndrias são aleatoriamente partilhadas entre as células filhas (LARSSON, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; TAANMAN, 1999). Esse processo estocástico conhecido por segregação mitótica pode resultar em significativas diferenças nos níveis de heteroplasmia entre células, principalmente entre tecidos mitóticos e pós-mitóticos. Ainda, mutações no mtDNA podem em alguns casos

serem selecionadas de modo tecido-específico por mecanismos pouco compreendidos (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Quando presente na linhagem germinativa uma mutação no mtDNA pode ser transmitida para a geração seguinte, mas a transmissão depende dos níveis de heteroplasmia (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009). Devido ao gargalo genético mitocondrial somente uma fração muito pequena das cerca de 250.000 cópias de mtDNA presentes no oócito são transmitidas para a próxima geração (POULTON et al., 2010). Como resultado, a frequência de uma dada mutação sofre drásticas mudanças de uma geração para outra, tendendo ao restabelecimento da homoplasmia. A teoria do gargalo genético mitocondrial (Figura 3), inicialmente proposta por Hauswirth e Laipis (ASHLEY; LAIPIS; HAUSWIRTH, 1989; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; HAUSWIRTH et al., 1984; LAIPIS; VAN DE WALLE; HAUSWIRTH, 1988; MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; OLIVO et al., 1983) sugere que a proliferação clonal de um pequeno grupo de moléculas de mtDNA durante o crescimento do oócito (WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008) e a subsequente redução do número de moléculas por célula durante o início do desenvolvimento embrionário (CREE et al., 2008; JENUTH et al., 1996; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008) poderiam explicar as rápidas mudanças na frequência genotípica mitocondrial entre gerações. Esta hipótese é baseada no grande aumento, de centenas a milhares de vezes, do número de cópias de mtDNA no oócito durante a oogênese (MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; OLIVO et al., 1983). Ainda, como o mtDNA não é replicado durante os primeiros estágios da embriogênese, as moléculas de mtDNA são forçadas a segregarem entre os diferentes tipos celulares do embrião (AIKEN; CINDROVA-DAVIES; JOHNSON, 2008; CREE et al., 2008; PIKÓ; TAYLOR, 1987). Uma vez que somente algumas células do blastocisto darão origem às células germinais primordiais (PGCs), que por sua vez darão origem às oogônias e posteriormente aos oócitos, as moléculas de mtDNA pré-existent no gameta feminino passam por uma espécie de gargalo em que somente um pequeno grupo de moléculas irá povoar os oócitos da geração seguinte (CREE et al., 2008; JENUTH et al., 1996; POULTON; MARCHINGTON, 2002; SHOUBRIDGE; WAI, 2007; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Embora esta teoria explique como a homoplasmia é rapidamente restabelecida após poucas gerações, o conhecimento sobre as bases moleculares do gargalo genético mitocondrial ainda é bastante superficial (CHIARATTI et al., 2011; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; STEWART et al., 2008b). Além disso, trabalhos recentes têm fornecido evidências de que mutações no mtDNA que causam disfunção da

mitocôndria são eliminadas mais eficientemente do que mutações “neutras”, sendo os mecanismos celulares responsáveis por tal eliminação desconhecidos (FAN et al., 2008; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O’FARRELL, 2014; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008a).

Figura 3 - Teoria do gargalo genético mitocondrial

Fonte: Adaptado de Stewart et al. (2008b).

Legenda: Na ilustração é demonstrada a queda no número de cópias de mtDNA por célula durante o desenvolvimento embrionário. O número de cópias diminui na linhagem germinativa até a diferenciação em células germinativas primordiais (PGCs), no 7.5. A posteriori, um grupo de cerca de 50 PGCs migra para as gônadas para dar origem às células germinativas femininas. Durante o desenvolvimento folicular não há um aumento exponencial da quantidade de mtDNA nos oócitos. [mtDNA] = concentração de mtDNA.

2.4 DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Doenças mitocondriais concernentes ao mtDNA podem se caracterizar como desordens oriundas de uma mutação (tanto mutações pontuais como rearranjos) que compromete diretamente a cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a função mitocondrial (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Até o momento, mais de 270 mutações pontuais já foram descritas, afetando cada gene do mtDNA (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Dentre as mutações pontuais, as mais comuns são: uma transição de A para G no nucleotídeo 3.243 do gene tRNA^{Leu(UUR)}, a qual causa encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo acidente vascular cerebral (MELAS); uma transição de A para G no nucleotídeo 8.344 do gene tRNA^{Lys}, a qual causa epilepsia mioclônica com fibras *Ragged-Red* (MERRF); e uma transversão de T para G no nucleotídeo 8.993 do gene *ATP6*, a qual causa neuropatia periférica, ataxia, retinite pigmentosa, convulsões e demência (NARP) e Síndrome de Leigh herdada matematicamente (MILS) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Com relação a rearranjos no mtDNA, os mais comuns são deleções parciais de grande escala que removem 2-10 kb de mtDNA (denominado Δ -mtDNAs) flanqueado por curtas sequências repetidas (5-13 pb) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Essas deleções podem ocorrer em praticamente qualquer porção da molécula de mtDNA, mas todas elas causam uma de três desordens patogeneticamente similares: Síndrome de Kearns-Sayre; Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva (CPEO); ou Síndrome de Pearson (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Surpreendentemente, mais da metade das mutações pontuais estão localizadas em genes que codificam tRNAs, embora tRNAs compreendam somente 10% da capacidade codificante do mtDNA (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; STEWART et al., 2008b). Os genes que codificam polipeptídeos, compreendendo quase 70% do genoma mitocondrial, respondem por somente 40% das mutações, e os dois genes codificadores de rRNAs (15% da capacidade codificante do mtDNA) respondem por somente 2% das mutações. Essa distribuição inesperada é provável que seja devida ao fato da maioria dos pacientes serem heteroplásmicos (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Além disso, com uma única exceção, todas mutações no mtDNA são “recessivas”: uma quantidade extremamente alta da forma mutante é necessária para manifestação do fenótipo clínico (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Por motivos desconhecidos, esta quantidade varia entre tipos mutantes e costuma ser maior para mutações

em genes codificadores de tRNAs (ao redor de 90%) do que em genes codificadores de proteínas (ao redor de 70-80%) (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; STEWART et al., 2008b). Assim, embora a prevalência de doenças causadas por mutações no mtDNA seja da ordem de 1 para 5.000, a frequência populacional das dez mutações patogênicas mais comuns no mtDNA é muito maior – aproximadamente 1 em 200 – sugerindo que muitos indivíduos normais são portadores de níveis subclínicos de mutações no mtDNA potencialmente patogênicas (POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

2.5 HERANÇA DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Estudos com modelos animais têm demonstrado que a transmissão de patologias codificadas pelo mtDNA depende dos mecanismos de seleção descritos acima (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009), os quais eficientemente restabeleceram a homoplasmia dentro de poucas gerações (FAN et al., 2008; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; JENUTH et al., 1996; KOEHLER et al., 1991; MA; XU; O'FARRELL, 2014; MEIRELLES; SMITH, 1997; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008a). Tais mecanismos poderiam assegurar que mutações no mtDNA não fossem transmitidas, uma vez que o restabelecimento da homoplasmia nos descendentes resultaria em seleção em nível do indivíduo (FREYER et al., 2012). Ademais, estudos recentes sugerem a existência de outros mecanismos de eliminação de mtDNAs portadores de mutações patogênicas em células germinativas, limitando a disseminação destas na população (FAN et al., 2008; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; LARSSON, 2009; MA; XU; O'FARRELL, 2014; SATO et al., 2007). Utilizando um modelo murino em que o mtDNA possuía uma deleção de 4.696 pares de bases, similar ao que ocorre na Síndrome de Kearns-Sayre (INOUE et al., 2000), Sato et al. (2007) reportaram diminuição do nível de Δ -mtDNA nos oócitos em função da idade. Esses resultados contrastam com a manutenção ou mesmo aumento dos níveis do Δ -mtDNA em células de tecidos somáticos dos mesmos animais. A diminuição nos oócitos foi tão acentuada que alguns descendentes mais jovens não continham Δ -mtDNA, embora seus irmãos mais velhos, 3nascidos de ninhadas anteriores, apresentassem níveis elevados da deleção. Num segundo estudo, Stewart et al. (2008a) investigaram a transmissão de mutações geradas ao acaso no mtDNA utilizando uma linhagem de camundongos mutante para um dos domínios da DNA

polimerase mitocondrial (*Polg*). O acasalamento de fêmeas homozigotas desta linhagem resultou na transmissão de múltiplas mutações pontuais no mtDNA para seus descendentes (STEWART et al., 2008a). O retrocruzamento destes com animais que não possuíam a mutação na *Polg* eliminou o alelo mutante, impedindo que novas mutações no mtDNA fossem geradas. A análise da segregação das mutações geradas evidenciou uma acentuada eliminação das mutações não sinônimas (STEWART et al., 2008a). Além disso, mutações em genes codificantes de tRNAs e rRNAs sofreram menor seleção do que genes codificantes de proteínas (STEWART et al., 2008a). A seleção menos intensa contra mutações em genes codificantes de tRNAs corrobora a observação de que em humanos mutações nestes genes respondem por 60% das doenças causadas por mutações no mtDNA, embora genes codificantes de tRNAs ocupam somente 10% da sequência do mtDNA (STEWART et al., 2008a, 2008b). Finalmente, Fan et al. (2008) relataram que fêmeas heteroplásmicas para uma mutação pontual no gene *mt-Nd6* também apresentaram um padrão dependente da idade de eliminação dos mtDNAs mutantes no oócitos, resultando na produção de descendentes livres da mutação.

Estes estudos são consistentes com outros relatos em humanos e camundongos (BROWN et al., 2001; FREYER et al., 2012; JENUTH et al., 1996; POULTON et al., 2010), e sugerem que a seleção é baseada no comprometimento da função mitocondrial, mas não esclarecem em que momento do desenvolvimento ela ocorre. Tal seleção explicaria algumas características do padrão de herança mitocondrial que antes eram difíceis de serem explicados (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; JACOBS et al., 2006; POULTON et al., 2009; STEWART et al., 2008b). Além disso, a hipótese de seleção purificadora é consistente com os mecanismos já descritos de eliminação de mitocôndrias paternas por autofagia (AL RAWI et al., 2011; SUTOVSKY et al., 1999, 2000). A base desta seleção poderia ser a redução do número de moléculas durante o início do desenvolvimento embrionário, quando o mtDNA não é replicado (AIKEN; CINDROVA-DAVIES; JOHNSON, 2008; CAO et al., 2007; CREE et al., 2008; WAI et al., 2010). A redução do número de moléculas maximizaria o efeito das mutações sobre o fenótipo da célula, tornando possível a seleção em nível celular (SHOUBRIDGE; WAI, 2008). Por exemplo, durante o período em que as PGCs migram para as gônadas e se diferenciam em oogônias, as células com mais mutações poderiam migrar e dividir-se mais lentamente, e consequentemente serem diluídas por células com menor heteroplasmia e, portanto, mais eficientes na geração de energia (FAN et al., 2008; SHOUBRIDGE, 2009; STEWART et al., 2008b). Por outro lado, somente cerca de 30% das

oogônias estabelecidas durante a vida fetal atingem o estágio de oócito maduro, as demais são eliminadas por apoptose (TILLY; TILLY, 1995). Uma vez que mitocôndrias disfuncionais frequentemente geram maiores níveis de EROS (FAN et al., 2008), este poderia ser o sinal para seleção negativa por apoptose das oogônias e/ou oócitos com maior heteroplasmia (FAN et al., 2008; WALLACE; FAN, 2009).

Um mecanismo alternativo seria a seleção em nível da organela (SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b). O número de mtDNAs é limitado de uma a duas moléculas por organela nas células germinais, contrastando com um número muito maior (e.g., 10 moléculas) em células somáticas (CAO et al., 2007; JANSEN; DE BOER, 1998). Desta forma, moléculas mutantes poderiam ser distinguidas das selvagens pelo efeito da mutação sobre a função mitocondrial. Isto posto, mitocôndrias disfuncionais poderiam ser eliminadas por mecanismos intracelulares como autofagia (SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b). Evidências deste mecanismo foram fornecidas por inúmeros trabalhos recentemente (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2008, 2010; SUEN et al., 2010; TWIG et al., 2008; YOULE; NARENDRA, 2011) ao mostrarem que mitocôndrias disfuncionais possuem menor capacidade de fusão e são seletivamente destruídas por autofagia (e.g., mitofagia). Embora tais relatos tenham como base estudos realizados com células somáticas, a ocorrência de autofagia também têm sido descrita em células germinais (TSUKAMOTO; KUMA; MIZUSHIMA, 2008; TSUKAMOTO et al., 2008) e, portanto, este mecanismo poderia estar envolvido na eliminação de mtDNAs mutantes. Uma segunda hipótese para a seleção em nível da organela seria a competição entre mitocôndrias saudáveis e mitocôndrias disfuncionais (HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014; SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b). Neste caso, as mitocôndrias disfuncionais seriam menos eficientes para a importação e função enzimática de proteínas codificadas pelo nDNA necessárias para a replicação do mtDNA. Uma vez que a disfunção mitocondrial resulta em perda do $\Delta\psi_m$, as mitocôndrias disfuncionais poderiam ser menos eficientes para a importação de fatores citoplasmáticos, pois estes poderiam ser atraídos pelas cargas negativas das mitocôndrias. Se verdadeiro, isto poderia resultar em vantagem replicativa das moléculas selvagens frente às mutantes (SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b). Embora Wai, Teoli e Shoubridge (2008) tenham reportado que uma sub-população de mtDNAs é preferencialmente replicada durante a foliculogênese visando povoar o oócito, não existem indícios em mamíferos de como esta sub-população é selecionada. Em drosófilas, foram fornecidas evidências que

confirmam que a seleção é baseada na atividade mitocondrial (HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014). Caso tal mecanismo de competição entre mitocôndrias se confirme, este poderia compreender a seleção de moléculas selvagens, o que explicaria o padrão observado de seleção purificadora descrito acima (SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b).

2.6 CONTROLE DE QUALIDADE MITOCONDRIAL

Dentre as teorias apresentadas acima pra explicar a seleção purificadora que elimina moléculas de mtDNA com mutações patogênicas, a degradação preferencial de mitocôndrias disfuncionais por autofagia é a que mais tem sido investigada. Evidências crescentes têm revelado que um conjunto de mecanismos atuam a nível celular com o objetivo de eliminar mitocôndrias disfuncionais por um mecanismo dependente do aumento das EROS e diminuição do $\Delta\psi_m$ (VRIES et al., 2012). De acordo com trabalhos pioneiros, repetidos ciclos de fusão e fissão mitocondrial resultam na produção de mitocôndrias que diferem em termos de $\Delta\psi_m$ e probabilidade de fusão (BUSCH; KOWALD; SPELBRINK, 2014; TWIG et al., 2008). Dentre essas mitocôndrias algumas caracterizam-se por apresentarem elevadas concentrações de EROS, baixo $\Delta\psi_m$ e diminuição da proteína de fusão Opa1, sendo seletivamente eliminadas por autofagia (DAI et al., 2014; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; SUEN et al., 2010; YOULE; NARENDRA, 2011). Aparentemente, o aumento das EROS e/ou a diminuição do $\Delta\psi_m$ resulta na translocação de PINK1 para a membrana mitocondrial externa, a qual consequentemente recruta Parkin do citosol para a membrana mitocondrial externa (SCARFFE et al., 2014; TWIG; SHIRIHAI, 2011; YANG; YANG, 2011; YOULE; NARENDRA, 2011). Considerando que Parkin é uma E3 ubiquitina ligase, ele irá ubiquitinar uma série de proteínas da membrana mitocondrial externa, incluindo Mfn1, Mfn2, VDAC1, Miro, entre outros. A ubiquitinação dessas moléculas resulta da destruição das mesmas nos proteossomos bem como no recrutamento da histona deacetilase 6 (Hdac6) e do Sequestosome 1 (p62/SQTM) para a membrana mitocôndria externa. HDAC6 e p62/SQTM parecem fazer o link entre mitocôndrias e autofagossomos, uma vez que estes se ligam simultaneamente às moléculas de ubiquitina adicionadas às proteínas da membrana mitocondrial externa e a componentes dos autofagossomos como Map1Lc3b. O recrutamento de autofagossomos resulta no englobamento das mitocôndrias ubiquitinadas, as quais são

posteriormente encaminhadas para destruição nos lisossomos (SCARFFE et al., 2014; TWIG; SHIRIHAI, 2011; YANG; YANG, 2011; YOULE; NARENDRA, 2011). Portanto, a ubiquitinação de proteínas da membrana mitocondrial externa resulta na destruição de proteínas envolvidas em processos como fusão (Mfn1 e Mfn2) e transporte mitocondrial (Miro) ao mesmo tempo que marca as mitocôndrias para destruição por autofagia (Figura 4).

Figura 4 - Modelo da mitofagia induzida pelo Parkin

Fonte: Adaptado de Hattori; Saiki; Imai (2014).

Legenda: No modelo apresentado a fusão e fissão mitocondrial atuam para a manutenção da função mitocondrial. Em condições normais o PINK1 é sempre degradado na organela. Porém, na presença de mutações no mtDNA há maior produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Isso acarretando no acúmulo de PINK1 e recrutamento do Parkin na membrana mitocondrial externa. Por sua vez, Parkin adiciona moléculas de ubiquitina a várias proteínas mitocondriais, resultando na eliminação autofágica da mitocôndria.

A confirmação da existência de mecanismos de eliminação seletiva de mitocôndrias disfuncionais em células humanas, sugere que mutações no mtDNA sejam seletivamente eliminadas em tecidos somáticos (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; VRIES et al.,

2012). Mesmo nos casos onde a mutação estivesse presente em heteroplasmia, era esperado que eventos seguidos de fusão e fissão mitocondrial segregassem estocasticamente as moléculas de mtDNA, resultando na produção de mitocôndrias com diferentes níveis de heteroplasmia. Mitocôndrias com elevados níveis de mtDNAs mutantes teriam sua função impactada pela mutação, resultando na destruição dessas pelos mecanismos de mitofagia descritos acima. No entanto, estudos com pacientes portadores de doenças mitocondriais indicam que para a maioria dos tecidos não há diminuição da heteroplasmia em função da idade (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; LARSSON, 2010; POULTON et al., 2010). Pelo contrário, como discutido anteriormente muitas das doenças mitocondriais apresentam fenótipo progressivo, ou seja, agravam-se com a idade devido ao acúmulo da mutação em tecidos como o muscular e o nervoso. Essa aparente contradição foi recentemente investigada utilizando a tecnologia de cíbridos e comprovou-se que apesar de mutações pontuais ou deleção no mtDNA resultarem em disfunção mitocondrial, as mitocôndrias portadoras dessas mutações não são seletivamente destruídas por mitofagia (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2010). Constatou-se que há necessidade de um estímulo autofágico para que a autofagia seja desencadeada. Para tanto, foi utilizado um tratamento com rapamicina, um inibidor de mTORC1, o que resultou num declínio progressivo dos níveis de heteroplasmia e parcial restauração da capacidade de síntese de ATP (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012). Observou-se também que algumas linhagens além de necessitarem de estímulo autofágico também expressavam reduzidos níveis de PINK1 e PARK2 (Parkin), sendo incapazes de desencadear o processo autofágico (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2010). Esses resultados fornecem evidências de prováveis mecanismos que limitariam a ocorrência de mitofagia nos casos de pacientes com doenças mitocondriais. Por outro lado, os excelentes resultados obtidos com o tratamento com rapamicina criam novas perspectivas de tratamento farmacológico para doenças mitocondriais.

No que se refere a seleção purificadora na linhagem germinativa, os mecanismos discutidos acima poderiam estar envolvidos na seleção contra graves mutações no mtDNA. A autofagia é um processo essencial para o desenvolvimento embrionário, sendo responsável pela destruição de fatores maternos herdados do oócito (TSUKAMOTO et al., 2008). Além disso, a eliminação de mitocôndrias paternas por autofagia durante os primeiros estágios do desenvolvimento (AL RAWI et al., 2011; SUTOVSKY et al., 1999, 2000), também fornece evidências de que o embrião possui toda a maquinaria necessária para realização de mitofagia.

Somado a isso, o embrião possui cerca de 100.000 mitocôndrias, as quais apresentam formato arredondado, típico de mitocôndrias que não realizam fusão e somente uma a duas moléculas de mtDNA estão presentes em cada organela (CAO et al., 2007; CHIARATTI; MEIRELLES, 2010; PIKÓ; CHASE, 1973; PIKÓ; TAYLOR, 1987; SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Todas essas características criam um cenário favorável a eliminação de moléculas mutantes baseado na disfunção da organela, uma vez que a baixa densidade de cópias e inexistência de fusão minimizariam a complementação mitocondrial, favorecendo a destruição das organelas com mtDNAs mutantes.

2.7 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO MITOCONDRIAL

Fotossensibilizadores são cromóforos que induzem as células a um dano químico após fotossensibilização. Em geral, a fotossensibilização envolve a absorção de luz pelo cromóforo após absorção pela célula, de modo que a interação entre o fotossensibilizador excitado e moléculas de O_2 produz oxigênio singlete ($^1O_2$), devido a falha da redução do oxigênio a água durante a OXPHOS, assim como outras formas de EROS (LUM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2002; MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS et al., 2004). Dentre os inúmeros fotossensibilizadores disponíveis, alguns se acumulam especificamente na mitocôndria pois são catiônicos e, portanto, atraídos pelas cargas negativas dessa organela. Dentre esses, o CMXRos é um dos mais potentes fotossensibilizadores mitocondriais. A fotossensibilização de células em cultivo com CMXRos induz a perda do $\Delta\psi_m$ e inchamento mitocondrial, subsequentemente resultando em apoptose (LUM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2002; MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS et al., 2004). Portanto, a fotossensibilização por uso de CMXRos se mostra como um interessante modelo para indução de danos mitocondriais e estudo da mitofagia.

Embora muitos dos trabalhos discutidos anteriormente tenham utilizado o tratamento com carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) para indução de perda do $\Delta\psi_m$ e mitofagia (LIM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2001), o uso de CCCP não é considerado biologicamente relevante já que resulta em despolarização de toda a rede mitocondrial (WANG et al., 2012; YANG; YANG, 2011). Uma vez que as mitocôndrias representam o principal sítio de produção de EROS nas células, têm se preconizado o uso

fotossensibilizadores em substituição ao CCCP. Estudos recentes que utilizaram fotossensibilizadores para indução de dano mitocondrial verificaram um processo autofágico dirigido contra as mitocôndrias com disfunção semelhante ao observado quando do uso de CCCP (WANG et al., 2012; YANG; YANG, 2011). Fotossensibilizadores como o CMXRos também já foram utilizados em oócitos resultando em defeitos na mitocôndria semelhante aos observados quando células somáticas foram fotossensibilizadas com este cromóforo (TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS; TROUNSON; JONES, 2006; THOUAS et al., 2004).

HIPÓTESES E OBJETIVOS

3 HIPÓTESES

O embrião é capaz de reconhecer mitocondriais disfuncionais e eliminá-las durante o desenvolvimento à blastocisto (Figura 5).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da transferência de citoplasma fotossensibilizado em zigotos no estágio de pró-núcleo com relação às taxas de desenvolvimento a blastocisto, número de cópias de mtDNA e heteroplasmia mitocondrial (Figura 6).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar as condições de fotossensibilização dos zigotos para obtenção de mitocôndrias disfuncionais (fase I);
- b) Determinar o efeito da transferência de citoplasma fotossensibilizado sobre a taxa de blastocisto, número de cópias de mtDNA e heteroplasmia mitocondrial (fase II);
- c) Se houver redução da heteroplasmia até o estágio de blastocisto nos embriões que receberam citoplasma fotossensibilizado, investigar se há o envolvimento de processos autofágicos na eliminação das mitocôndrias introduzidas (fase III).

Figura 5 - Modelo hipotético para a destruição de mitocôndrias portadoras de mtDNAs mutantes

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014).

Legenda: A figura ilustra a segregação ao longo da oogênese e embriogênese de dois haplótipos mitocondriais, sendo o mtDNA em verde o selvagem e o mtDNA em vermelho o mutante. No início da oogênese (estágio de folículo primordial) as mitocôndrias dos oócitos são maiores e contêm múltiplas cópias dos dois mtDNAs, estando o mtDNA selvagem em maioria dentro de cada organela. Com isso, a função mitocondrial é normal, uma vez que o efeito do mtDNA mutante é minimizado pelo excesso de cópias selvagens. Nos estágios seguintes (folículo primário a oócito maduro) a quantidade de mtDNA aumenta dramaticamente. No entanto, a fragmentação mitocondrial acompanhada talvez pela multiplicação das mitocôndrias resulta na redução do número de mtDNAs por organela (evento denominado meiose mitocondrial). Numa situação ideal, se o número de mitocôndrias no oócito correspondesse ao número de moléculas de mtDNA, cada organela abrigaria somente uma única cópia de mtDNA (vide oócito maduro) e a existência de mutações no mtDNA se refletiria diretamente na função da organela. Neste caso, as mitocôndrias disfuncionais, e consequentemente os mtDNAs mutantes, poderiam ser eliminados por autofagia (vide embrião 2 células) e a mutação não seria transmitida para a geração seguinte.

Figura 6 - Delineamento experimental

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014).

Legenda: O esquema ilustra as análises propostas para as três fases do projeto.

MATERIAIS E MÉTODOS

---

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

As linhagens C57BL/6, NZB/BINJ e CBA/J utilizadas neste experimento procederam do Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP, Pirassununga). Inicialmente, dez fêmeas da linhagem NZB/BINJ foram acasaladas com machos C57BL/6 e as fêmeas produzidas nestes acasalamentos foram retrocruzadas com seus respectivos pais por um mínimo de cinco gerações antes de serem utilizadas. Ao longo dos acasalamentos o genótipo mitocondrial dos animais foi determinado utilizando DNA total extraído de biópsia da cauda e PCR em tempo real como descrito abaixo. Estes acasalamentos foram realizados como comumente descritos por trabalhos científicos da área com o objetivo de obter fêmeas portadoras de genótipo nuclear da linhagem C57BL/6 e genótipo mitocondrial da linhagem NZB/BINJ (JENUTH et al., 1996; MEIRELLES; SMITH, 1997). Este tipo de cuidado tem sua importância uma vez que a grande maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo nDNA (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Uma vez que planejava-se introduzir mitocôndrias advindas de zigotos NZB/BINJ em zigotos C57BL/6, isso poderia resultar em viés aos experimentos considerando que as mitocondrias introduzidas poderiam ser reconhecidas como estranhas devido a presença de proteínas na membrana externa da mitocôndria codificadas por um genoma diferente do zigoto receptor (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Ainda, animais NZB/BINJ apresentam uma série de anormalidades autoimunes e são subférteis, o que poderia representar um entrave aos experimentos. Depois de cinco gerações de retrocruzamentos, matrizes com mtDNA NZB/BINJ e nDNA C57BL/6 foram estabelecidas e dali em diante mantidas por acasalamentos entre irmãos. Esses animais serão daqui em diante denominados como sendo da linhagem NZB. As filhas produzidas nestes acasalamentos foram utilizadas como doadoras de embrião por acasalamento com machos híbridos (F1), filhos de pais CBA/J com mães C57BL/6. Esses embriões, no estágio de zigoto pró-nuclear, foram utilizados como doadores de citoplasma nos experimentos de micromanipulação. Os zigotos utilizados como receptores de citoplasma foram obtidos pelo acasalamento de machos e fêmeas híbridos (F1), filhos de pais CBA/J com mães C57BL/6. Esses animais serão denominados daqui em diante como sendo da linhagem B6. Devido a herança mitocondrial de origem exclusivamente materna (SHOUBRIDGE; WAI, 2007), os

zigotos utilizados como doadores de citoplasma eram sempre portadores de mtDNA NZB, enquanto os utilizados como receptores de citoplasma eram portadores de mtDNA B6.

5.2 COLETA E CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Fêmeas das linhagens B6 e NZB, com idade entre 4 e 7 semanas, foram superovuladas por injeção intra-peritoneal de 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal, Summit, EUA) e 5 U.I. de hCG (gonadotrofina coriônica humana; Chorulon, MSD Saúde Animal, Summit, EUA) com intervalo de 46 a 48 horas entre as duas injeções (NAGY et al., 2003). Após a administração de hCG, as fêmeas foram pareadas com machos B6 e inspecionadas, na manhã seguinte, quanto a presença de *plug* vaginal (NAGY et al., 2003). Embriões no estágio de zigoto pró-nuclear foram coletados 21 h após a administração de hCG por rompimento da ampola do oviduto na presença de meio FHM (NAGY et al., 2003). Os embriões viáveis recuperados foram desnudados das células dos cumulus por pipetagem em solução com 0,3% de hialuronidase e a seguir cultivados *in vitro* por 96 h. Cerca de 20 embriões foram cultivados por gota de 40 µl de meio KSOM (ERBACH et al., 1994; NAGY et al., 2003) sob óleo mineral em incubadora a 37°C com máxima umidade e 5% de CO₂ em ar. A análise do desenvolvimento à blastocisto foi realizada em microscópio estereoscópico 96 h após a coleta dos embriões, por determinação da porcentagem de embriões que atingiram o estágio de blastocisto.

Nos experimentos em que os embriões foram tratados com rapamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), este foi realizado por cultivo embrionário em meio KSOM contendo 250 nM de rapamicina.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

Zigotos da linhagem NZB foram imediatamente após a coleta incubados por 30 min em meio FHM suplementado com 500 nM de CMXRos (Molecular Probes, Eugene, EUA). A concentração de CMXRos utilizada foi escolhida com base no que é proposto pelo fabricante e também com base em trabalhos prévios (MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al.,

2005). Após a incubação, os embriões foram lavados três vezes em meio FHM, colocados em grupos de 20 em gotas de 90 μ l de FHM cobertas com óleo mineral e fotossensibilizados por 0, 2,5, 5, 10, 20 ou 60 s (grupos F0, F2,5, F5, F10, F20 e F60, respectivamente). Também foi considerado um controle para a fotossensibilização (grupo CF) no qual os embriões foram fotossensibilizados por 60 s sem incubação prévia com CMXRos. Para a fotossensibilização os embriões foram antes focalizados em luz branca e então fotossensibilizados com o auxílio de objetiva de 20x. A fotossensibilização foi realizada em microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 (Nikon do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Nikon Instruments Inc.) equipado com uma lâmpada de mercúrio (HBO 50W/AC 39V) com luminância de 30.000 cd/cm. O filtro utilizado para a fotossensibilização foi o Y-2E/C (Texas Red), o qual possibilita a excitação na faixa de 540 a 580 nm. Como controle para este experimento (grupo C) também foram considerados zigotos que não foram fotossensibilizados e nem incubados com CMXRos (MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005). Todos os grupos experimentais foram cultivos *in vitro* para análise do desenvolvimento à blastocisto.

5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DISTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL

O $\Delta\psi_m$ foi avaliado 3 h após a fotossensibilização por incubação dos embriões dos grupos F0, F10, F20 e F60 em meio FHM com 10 μ M de rodamina 123 (Life Technologies, Carlsbad, EUA) por 30 min. Os embriões foram a seguir lavados três vezes em FHM e analisados por microscopia epi-fluorescente utilizando o mesmo microscópio descrito acima para o procedimento de fotossensibilização. Para análise da marcação com rodamina 123 foi utilizado o filtro B-2A que possibilita excitação na faixa de 450 a 490 nm e emissão acima de 520 nm. Os embriões foram analisados com o auxílio de objetiva de 20x. Posteriormente, os embriões foram tratados com 100 μ M CCCP (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 20 min e novamente analisados quanto ao a marcação com rodamina 123.

Para análise da distribuição mitocondrial, 3 h após a fotossensibilização os embriões dos grupos F0, F20 e F60 foram fixados por 15 min à temperatura ambiente em 3,7% paraformaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em solução tampão fosfatada (PBS) contendo 0,1% de polivinilpirrolidona (PVP; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A seguir, os embriões foram lavados três vezes em

PBS contendo 0,1% PVP e montados com ProLong Gold (Life Technologies, Carlsbad, EUA) em lâminas com lamínulas. Os embriões foram avaliados em microscópio confocal invertido Zeiss LSM710, com o software ZEN v. 2008 (Oberkochen, Alemanha). Para análise da distribuição mitocondrial os embriões foram analisados com base na marcação do CMXRos utilizado no tratamento de fotossensibilização. Para tanto, utilizou-se o laser HeNe para excitação em 543 nm e emissão na faixa de 580 a 650 nm. Os embriões foram observados com auxílio de uma objetiva de 100x com imersão em óleo e as imagens obtidas por ajuste do plano focal na região central dos embriões.

5.5 TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA

Embriões das linhagens B6 e NZB foram coletados como descrito acima para serem utilizados nos experimentos de transferência de citoplasma. Os embriões da linhagem NZB foram divididos em dois grupos e fotossensibilizados como descrito acima considerando os grupos F0 e F20. Metade dos embriões de cada um desses grupos foi imediatamente cultivado *in vitro* enquanto a outra metade foi utilizada como doador de citoplasma. Parte dos embriões da linhagem B6 também foi imediatamente cultivada enquanto os demais foram utilizados como receptores de citoplasma. A transferência de citoplasma de embriões NZB dos grupos F0 ou F20 para zigotos B6 resultou na produção de dois grupos que foram chamados de TC-F0 e TC-F20, respectivamente. Para a microcirurgia, os zigotos NZB (F0 e F20) e B6 foram incubados separadamente em gotas de meio FHM suplementado com 5 µg/ml de citocalasina B e 0,5 µg/ml de nocodazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O procedimento de microcirurgia foi realizado utilizando-se um microscópio invertido (Leica DMI RB; Leica, Solms, Alemanha) acoplado a um sistema de micromanipulação e microinjeção (Narishige, Nova Iorque, EUA) (NAGY et al., 2003). A transferência de citoplasma foi realizada por remoção de aproximadamente 30% do volume citoplasmático de zigotos B6, seguido pela introdução no espaço perivitelínico desses de aproximadamente a mesma quantidade de citoplasma de zigotos NZB. Os pró-núcleos dos zigotos foram sempre focalizados para evitar que esses fossem erroneamente aspirados. Após a transferência de citoplasma os zigotos foram transferidos para solução de eletrofusão (0,28 M manitol, 0,1 mM MgSO₄, 0,5 mM HEPES e 0,05% BSA) e submetidos a um pulso elétricos de 1 kV/cm (DC) por 45 µs (Multiporator, Eppendorf) para fusão das membranas do citoplasto e do zigoto. Os zigotos

fundidos, grupos TC-F0 e TC-F20, também foram cultivados *in vitro* para análise do desenvolvimento à blastocisto.

5.6 LISE DOS EMBRIÕES

Para análise da heteroplasmia e do número de cópias de mtDNA, foram utilizados zigotos pró-nucleares (imediatamente após a transferência de citoplasma) e blastocistos (coletados 96 h após o cultivo *in vitro*). Esses embriões foram lavados três vezes em PBS suplementado com 0,1% PVP e armazenados individualmente em 1 µl de PBS com 0,1% PVP em microtubos de 0,2 ml à -20°C. Os embriões foram lisados por incubação em 4 µl de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/ml proteinase K] por 3 h à 55°C (SHITARA et al., 2000). Ao final, as amostras foram incubadas por 10 min à 95°C para inativação da proteinase K, diluídas pela adição de 45 µl de água ultrapura e usadas para análise da heteroplasmia e do número de cópias de mtDNA.

5.7 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BIÓPSIA DA CAUDA DE CAMUNDONGOS

Para confirmação do genótipo mitocondrial das matrizes utilizadas nos experimentos o DNA total foi extraído de biópsia da cauda desses animais. Para tanto, os mesmos foram anestesiados por administração intraperitoneal de 0,40-0,45 ml (0,02/g de peso) de uma solução contendo 1 mg/ml de cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 5 mg/ml de cloridrato de ketamina (Francotar, Virbac Saúde Animal, São Paulo, Brasil), e a porção final da cauda (cerca de 1 cm de comprimento) cortada com lâmina de bisturi estéril. O DNA total foi extraído como descrito previamente (CREE et al., 2008). Resumidamente, o tecido coletado foi incubado em 0,5 ml de tampão (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 0,4 M de NaCl; 2 mM de EDTA), 200 µl de 20% SDS e 250 µl de proteinase K a 5 mg/ml por 16 h à 55°C. A seguir, o DNA foi purificado por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e precipitação com isopropanol. O DNA foi lavado em etanol 70%, eluído em água ultrapura e sua concentração determinada por mensuração da

absorbância a 260 nm (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, EUA). O DNA extraído foi armazenado à -20°C até o uso.

5.8 ANÁLISE DA HETEROPLASMIA MITOCONDRIAL

A heteroplasmia mitocondrial foi determinada por amplificação seletiva dos mtDNAs NZB ou B6 em reações separadas utilizando-se a tecnologia de ARMS-PCR (NEWTON et al., 1989). Para tanto, as sequências de mtDNA NZB (L07095.1) e B6 (NC_005089.1) foram comparadas visando a identificação de polimorfismos, dos quais foram identificados somente polimorfismos de base única (SNPs). Com base nesta análise foram desenhados *primers* (Tabela 1) utilizando-se o software Primer Express v. 3.0 (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Os *primers* ARMS22 e MT20 deveriam anelar entre os nucleotídeos 3.578 e 3.695 do mtDNA NZB (parte do gene *mt-Nd1*) enquanto os *primers* ARMS2 e MT14 deveriam anelar entre os nucleotídeo 3.815 e 3.960 do mtDNA B6 (parte dos genes *mt-Tq*, *mt-Tm* e *mt-Nd2*). As reações de PCR em tempo real foram realizadas num volume final de 15 µl contendo 200 nM de cada *primer*, 1x Power SYBR Gene Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e 0,5 ng de DNA (no caso de DNA extraído de tecido) ou 5 µl (10%) de lisado (no caso de embrião). Para amplificação foi utilizado o equipamento ABI PRISM SDS 7500fast HT Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e as seguintes condições térmicas: desnaturação inicial a 95°C por 10 min seguido de 45 ciclos consistindo de 95°C por 15 s e 62°C por 1 min. A fluorescência do SYBR Green foi mensurada ao final de cada passo de extensão (62°C). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e as amplificações analisadas como sugerido pelo fabricante do equipamento (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A porcentagem de mtDNA NZB foi calculada para uma dada amostra em relação à quantidade total de mtDNA na mesma, estimada pela soma das amplificações específicas para os mtDNAs NZB e B6.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA

O número de cópias de mtDNA dos embriões foi estimado baseado no que foi descrito previamente (WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008), com algumas modificações.

Resumidamente, o mtDNA total foi amplificado utilizando-se os *primers* MT14 e MT15 (Tabela 1) que deveriam anelar indiscriminadamente sobre os mtDNAs de NZB e B6 entre os nucleotídeos 3.815 e 3.962 (parte dos genes *mt-Tq*, *mt-Tm* e *mt-Nd2*). Os *primers* MT14 e MT15 também foram utilizados para amplificação em paralelo de um controle externo contendo uma quantidade conhecida de cópias. Este controle externo foi construído de modo semelhante ao descrito por Wai, Teoli e Shoubridge (2008) por clonagem num vetor TOPO TA (Life Technologies, Carlsbad, EUA) de um fragmento de 736 pares de bases compreendendo os nucleotídeos 3.455 e 4.190 do mtDNA B6. Alíquotas de 3 µl do controle externo na concentração de $0,2 \times 10^9$ moléculas/µl foram armazenadas a -80°C e utilizadas por diluição de 2 µl do controle externo em 18 µl de solução de lise. Dessa diluição, 5 µl foram aliqotados para digestão como descrito para os embriões. Ao final, o controle externo foi diluído por adição de 45 µl de água ultrapura. As reações de PCR em tempo real foram realizadas como descrito acima para análise da heteroplasmia. O controle externo foi diluído serialmente para construção de uma curva-padrão contendo 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 moléculas por reação. Por interpolação, utilizando-se os dados das curvas de amplificação do controle externo e dos embriões, foi possível estimar o número de cópias de mtDNA nos embriões com o auxílio do software SDS v. 2.06 (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A quantidade final de cópias de mtDNA por embrião foi obtida multiplicando-se a quantidade estimada por 10 vezes já que somente 10% do volume do lisado foi utilizado nas reações de amplificação.

5.10 ANÁLISE DE HETEROPLASMIA E DE AUTOFAGOSSOMOS DOS EMBRIÕES TRATADOS COM RAPAMICINA

Para a análise de heteroplasmia os embriões foram coletados e cultivados como descrito acima, sendo que no KSOM para cultivo foi acrescentado 250 nM de Rapamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para análise da heteroplasmia os embriões dos grupos TC-F0 e TC-F20 tratados com rapamicina foram coletados no estágio de blastocisto como descrito anteriormente. Para análise dos autofagossomos, embriões no estágio de duas células (24 h após a coleta de embriões) foram fixados e permeabilizados como descrito acima. A seguir os embriões foram incubados por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo policlonal anti-Map1Lc3b produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído 1:200 em PBS com 0,1% de PVP (GILKERSON et al., 2012). Após lavagem em PBS com

0,1% de PVP, os embriões foram incubados por 1 h com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, EUA), o qual foi diluído 1:200 em PBS com 0,1% de PVP. Finalmente, os embriões foram lavados em PBS com 0,1% de PVP e com auxílio de ProLong Gold montados em lâminas com lamínulas. Os embriões foram analisados em microscópio confocal invertido conforme descrito acima. Para visualização dos autofagossomos foi considerado excitação e emissão na faixa de 495 e 519 nm, respectivamente. As mitocôndrias coradas com CMXRos foram visualizadas considerando-se excitação de 543 nm e emissão na faixa entre 580 e 650 nm. Os embriões foram observados com auxílio de uma objetiva de 100x com imersão em óleo e as imagens obtidas por ajuste do plano focal na região central dos embriões. Para análise da colocalização de autofagossomos e mitocôndrias foi utilizado uma abertura de 4,8x do pinhole.

5.11 ANÁLISE DOS DADOS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, EUA) e nível máximo de significância igual a 5% (erro α). Foi sempre testado se os dados de uma determinada análise seguiam as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variâncias, caso contrário os dados eram transformados (e.g., raiz quadrada, exponencial ou log). A maioria dos dados foi analisada por ANOVA de uma via e teste de médias de Tukey. Quando diferentes períodos de fotossensibilização foram analisados utilizou-se a ANOVA e a comparação de médias por Duncan. Nos casos em que mais de um fator foi considerado (e.g., grupo experimental e estágio do desenvolvimento) os dados foram analisados por ANOVA de duas vias e teste de médias de Tukey. Os dados são apresentados no texto como médias seguidas do erro padrão da média. Em alguns casos o coeficiente de variação (CV) é apresentado como medida de dispersão.

RESULTADOS

---

6. RESULTADOS

6.1 ENSAIO PARA ANÁLISE DE NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA E HETEROPLASMIA MITOCONDRIAL

Considerando que somente SNPs estão presentes ao alinhar as sequências de mtDNA B6 e NZB, decidiu-se lançar mão da estratégia de ARMS-PCR (LEE et al., 2012), proposta por Newton et al. (1989), para que fosse possível distinguir estas sequências por PCR em tempo real. Para tanto, inicialmente foram desenhados 12 pares de *primers* visando testar se o SNP presente na posição 3.932 do mtDNA (troca de G para A) poderia ser utilizado para esta finalidade (Tabela 1). Dentre todos os ensaios testados, o que era baseado no *primer* ARMS2 (*reverse*) juntamente com o *primer* MT14 (*forward*) foi o que melhor discriminou as sequências, possibilitando um limite de detecção de 0,01% (Figura 7). Uma vez que a amplificação foi realizada utilizando a tecnologia TaqMan (Life Technologies, Carlsbad, EUA), também foi considerado nas amplificações iniciais uma sonda (MT16-FAM) que se anelava entre os *primers* ARMS2 e MT14 (Tabela 1). A discriminação entre as sequências de mtDNA B6 e NZB foi possível uma vez a extremidade 3' do *primer* ARMS2 termina sobre o SNP selecionado (posição 3.932 do mtDNA) e esta é complementar a variante G presente no mtDNA B6. Além disso, foi desenhado um *mismatch* arbitrário na penúltima base da extremidade 3' do *primer* ARMS2 por substituição de um T por um G. Esse *mismatch* não afetou significativamente a extensão da sequência quando o alvo era o mtDNA B6. No entanto, quando o alvo era o mtDNA NZB, esse *mismatch* somado ao *mismatch* da última base (devido à presença do SNP) impediu a extensão pela Taq DNA polimerase com eficiência de 99,99%. Ao utilizar-se um segundo ensaio que compartilha o *primer* MT14 e a sonda MT16-FAM, mais um *primer reward* alternativo, MT15 (Tabela 1), foi possível amplificar indiscriminadamente ambos os mtDNAs B6 e NZB. O *primer* MT15 não anela sobre o SNP na posição 3.932 (a extremidade 3' deste *primer* termina na posição imediatamente anterior ao SNP) e, por isso, não discrimina os mtDNAs. Portanto, por meio deste segundo ensaio não discriminativo foi possível estimar o número total de cópias de mtDNA nos embriões. Ainda, a porcentagem de mtDNA B6 foi estimada pela razão da amplificação específica para o mtDNA B6 pela amplificação de ambos os mtDNAs B6 e NZB.

Figura 7 - Análise da heteroplasmia mitocondrial por ARMS-PCR

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: a) Teste de sensibilidade para detecção de mtDNA B6 em mostras heteroplásmicas. O teste mostra que o ensaio é capaz de detectar até 0,1% de mtDNA B6 enquanto que a amplificação inespecífica de mtDNA NZB pelo *primer* específico para B6 só ocorre alguns ciclos depois, permitindo a discriminação de até 0,01%. Também é apresentada a curva de amplificação referente a um embrião heteroplásmico. b) Regressão linear entre a porcentagem de mtDNA B6 usado na reação e a quantidade mensurada pelo ensaio de ARMS-PCR. Diferentes níveis de mtDNA B6 (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100%) foram obtidos pela mistura de DNA total extraído da cauda de camundongos NZB e B6. Observa-se um coeficiente de regressão (r^2) bastante próximo de 1, o que indica que o ensaio é preciso em estimar os níveis de mtDNA B6 nas amostras heteroplásmicas.

Tabela 1 - *Primers* e sonda TaqMan usados para quantificação da heteroplasmia mitocondrial e do número de cópias de mtDNA

Ensaio ^a	Primer/sonda	Sequência (5' - 3') ^b
ND	MT14	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC
	MT15	GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG
	MT16-FAM	FAM-CGGGCCCATACCCCGAAAACG-BHQ1
D ^c	ARMS1	CTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGc <u>C</u>
	ARMS2	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGt <u>C</u>
	ARMS3	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGa <u>C</u>
	ARMS4	CTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATcG <u>C</u>
	ARMS5	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATtG <u>C</u>
	ARMS6	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATaG <u>C</u>
	ARMS7	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGc <u>T</u>
	ARMS8	ACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGt <u>T</u>
	ARMS9	ACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGa <u>T</u>
	ARMS10	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATcG <u>T</u>
	ARMS11	ACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATtG <u>T</u>
	ARMS12	ACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATaG <u>T</u>

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Notas: ^aND, ensaio não discriminativo para detecção das linhagens B6 e NZB; D, ensaio discriminativo específico para B6.

^bNucleotídeos sublinhados são específicos para B6; Letras em caixa baixa representam *mismatches* introduzidos arbitrariamente.

^cO ensaio é composto por um dos *primers* ARMS listados em combinação com o primer MT14 e a sonda MT16-FAM.

Afim de testar a sensibilidade do ensaio descrito acima foram utilizados embriões heteroplásmicos produzidos por transferência de citoplasma, os quais tiveram a heteroplasmia e o número de cópias de mtDNA mensurados. Como resultado, observou-se que zigotos B6 continham em média 497.753 ± 146.018 cópias de mtDNA, valores estes comparáveis aos descritos na literatura (CAO et al., 2007, 2009; CREE et al., 2008; THUNDATHIL; FILION; SMITH, 2005; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Já a quantidade de mtDNA NZB introduzida nos zigotos B6 correspondeu a 19,1% do total de cópias, calculado com base na quantidade de mtDNA B6 estimada pelo ensaio específico para o mtDNA desta linhagem

(80,9% $\pm$ 3,70 de mtDNA B6). Considerando que após a transferência de citoplasma os embriões continham um total de 365.022 $\pm$ 33.062 cópias, a quantidade de mtDNA NZB introduzida equivaleu a 69.719 cópias. Embora esses valores estivessem dentro do esperado considerando o volume citoplasmático introduzido, observou-se que o ensaio de mensuração de heteroplasmia era eficiente somente para a detecção de reduzidos níveis de mtDNA B6 (limite de 0,1%), não apresentando a mesma eficiência quando a quantidade de mtDNA B6 era elevada (o que equivale a reduzidos níveis de mtDNA NZB). Um CV acima de 10% foi observado quando a porcentagem de mtDNA B6 ultrapassava 50%, exigindo que a quantificação fosse realizada três ou mais vezes para obtenção de um valor confiável. Neste sentido, um outro SNP (na posição 3.599 do mtDNA) foi selecionado objetivando o desenho de um segundo ensaio ARMS (ARMS22) específico para a sequência de mtDNA NZB (Tabela 2). A utilização do *primer* ARMS22 juntamente com o *primer* MT20 se mostrou tão específica na amplificação de mtDNA NZB quanto o *primer* ARMS2 juntamente com o *primer* MT14 se mostrou na amplificação de mtDNA B6 (Figura 8). Além disso, observou-se que a utilização de SYBR Green durante as reações foi mais eficiente para detecção de pequenas quantidades de mtDNA do que a utilização de uma sonda TaqMan. Dessa forma, passou-se a calcular a heteroplasmia mitocondrial por amplificação, em paralelo, do mtDNA B6 utilizando-se os *primers* ARMS2 e MT14 e do mtDNA NZB utilizando-se os *primers* ARMS22 e MT20 (Tabela 2). O número total de cópias de mtDNA continuou sendo estimado por amplificação simultânea de ambos os mtDNAs B6 e NZB utilizando os *primers* MT14 e MT15 (Tabela 2).

Figura 8 - Análise de heteroplasmia mitocondrial por ARMS-PCR

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Regressão linear entre a porcentagem de mtDNA NZB usado na reação e a quantidade mensurada pelo ensaio ARMS-PCR. Diferentes níveis de mtDNA NZB (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99, 99,5, 99,9 e 100%) foram obtidos pela mistura de DNA total extraído da cauda de camundongos NZB e B6. Observa-se um coeficiente de regressão (r^2) bastante próximo de 1, o que indica que o ensaio é preciso em estimar a porcentagem de mtDNA NZB nas amostras heteroplásmicas.

Tabela 2 - Primers usados para quantificação da heteroplasmia mitocondrial e do número de cópias de mtDNA

Ensaio ^a	Primer	Sequência (5' - 3') ^b
ND ^c	MT14	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC
	MT15	GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG
ARMS-B6 ^c	MT14	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC
	ARMS2	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG <u>C</u>
ARMS-NZB ^c	MT20	TGGCACTCCCGCTGTAAAAA
	ARMS22	TTATCCACGCTTCCGTTACG <u>tC</u>

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Notas: ^aND, ensaio não discriminativo para detecção das linhagens B6 e NZB; ARMS-B6, ensaio discriminativo específico para B6; ARMS-NZB, ensaio discriminativo específico para NZB.

^bNucleotídeos sublinhados são específicos para B6 ou NZB; Letras em caixa baixa representam mismatches introduzidos arbitrariamente.

^cOs ensaios são compostos por um primer *foward* (MT14 ou ARMS22) e um *reward* (MT15, ARMS2 ou MT20).

6.2 A FOTOSSENSIBILIZAÇÃO RESULTA EM BLOQUEIO DO DESENVOLVIMENTO À BLASTOCISTO E DIMINUIÇÃO DO $\Delta\psi_M$

Com base nos achados de Minamikawa et al. (1999) e Takeuchi et al. (2005), zigotos no estágio pró-nuclear foram incubados com CMXRos e em seguida fotossensibilizados por diferentes períodos antes de serem cultivados para análise do desenvolvimento (Figura 9). Como resultado, observou-se que a fotossensibilização por 2,5 s não apresentou efeito sobre a taxa de blastocisto quando comparado com embriões que não foram fotossensibilizados, independente de terem sido (grupo F0) ou não (grupo C) tratados com CMXRos. No entanto, a fotossensibilização por período igual ou superior a 5 s resultou em redução progressiva da taxa de blastocisto, sendo o desenvolvimento completamente bloqueado quando a fotossensibilização foi realizada por 20 ou 60 s (Figura 9). Por outro lado, a fotossensibilização por 60 s de embriões que não foram tratados com CMXRos (grupo CF) não foi prejudicial ao desenvolvimento uma vez que estes embriões não diferiram em termos de desenvolvimento de embriões que não foram fotossensibilizados (Figura 9). Estes resultados indicam que há uma associação negativa entre o tempo de fotossensibilização e a taxa de blastocisto, e que o efeito da fotossensibilização é dependente do tratamento com CMXRos.

Figura 9 - Análise do desenvolvimento a blastocisto de zigotos tratados ou não com CMXRos e fotossensibilizados por diferentes períodos de tempo

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Os valores dentro das barras indicam o número de embriões que se desenvolveram a blastócito em relação ao total de embriões cultivados. Os resultados apresentados são referentes a 15 replicatas biológicas. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre os grupos experimentais ($P < 0,0001$).

Com base em trabalhos prévios que também realizaram fotossensibilização por tratamento com CMXRos (LUM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2002; MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005), era esperado que o efeito sobre o desenvolvimento fosse devido aos danos causados pela excitação do CMXRos na mitocôndria. Com o objetivo de confirmar esta suposição, zigotos foram fotossensibilizados por 0 ou 60 s e avaliados 3 h depois quanto ao $\Delta\psi_m$ por marcação com rodamina 123 e análise em microscópio de epifluorescência (Figura 10). Nota-se que após este período os embriões fotossensibilizados (grupo F60) apresentavam sinais claros de degeneração celular, como indicado pela presença de fragmentos citoplasmáticos semelhantes a corpos apoptóticos (Figuras 10i, 10m). A análise

da marcação com rodamina 123 também indicou que houve colapso do $\Delta\psi_m$, como representado pelo padrão de marcação difusa do corante nos embriões do grupo F60 (Figura 10n). Nos embriões que não foram fotossensibilizados (grupo F0), a marcação com rodamina 123 apresentou-se melhor definida, sendo possível observar as mitocôndrias distribuídas ao redor dos pró-núcleos como esperado para embriões neste estágio do desenvolvimento (Figura 10f). Resultados semelhantes foram relatados por Thouas et al. (2004) ao avaliarem o $\Delta\psi_m$ por marcação com rodamina 123. Os autores interpretaram que o padrão difuso de marcação deve-se à liberação da rodamina 123 de volta para o citosol provavelmente causado pela ocorrência de transição de permeabilidade mitocondrial. Para confirmação de que o tratamento fotossensibilizante resultou em redução do $\Delta\psi_m$, os embriões de ambos os grupos foram tratados com CCCP. O tratamento com este composto deveria resultar em desacoplamento mitocondrial com consequente colapso do $\Delta\psi_m$. A análise da marcação com rodamina 123 posteriormente ao tratamento com CCCP mostrou um padrão difuso de fluorescência nos embriões de ambos os grupos, F0 e F60, e esta marcação não diferiu daquela que os embriões do grupo F60 apresentavam antes do tratamento com CCCP. Embriões fotossensibilizados por período inferior a 60 s também foram analisados em luz branca e por coloração com rodamina 123, porém não apresentaram efeito característico do tratamento 3 h após a fotossensibilização.

Figura 10 - Análise do efeito da fotossensibilização sobre o $\Delta\psi_m$

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Zigotos dos grupos F0 e F60 foram corados com rodamina 123 e avaliados em microscópio invertido utilizando luz branca (a, e, i, m, c, g, k, o) e epi-fluorescência (b, f, j, n, d, h, l, p). A análise em luz branca 3 h após a fotossensibilização (a, e, i, m) indicou sinais de fragmentação celular nos embriões do grupo F60 (i, m). A análise dos mesmos embriões com epi-fluorescência mostrou um padrão difuso de marcação da rodamina 123, indicativo de queda do $\Delta\psi_m$ (j, n). A seguir, os embriões foram tratados com CCCP e analisados novamente em luz branca (c, g, k, o) e epi-fluorescência (d, h, l, p). Após o tratamento com CCCP os embriões mantiveram a mesma morfologia em luz branca, independente de ter sido ou não fotossensibilizado. O tratamento com CCCP resultou em marcação difusa da rodamina 123 nos embriões do grupo F0 (d, h), semelhante à marcação observada antes do tratamento com CCCP nos embriões fotossensibilizados por 60 s (j, n). Nos embriões do grupo F60 s não houve alteração do padrão de marcação da rodamina 123 após o tratamento com CCCP (l, p). As fotos foram obtidas com objetiva de 20x (a, b, c, d, i, j, k, l). A barra de tamanho em (a) corresponde a 40 μm . As setas em (a, b, c, d, i, j, k, l) indicam embriões que em (e, f, g, h, m, n, o, p) são observados com maior detalhe. A barra de tamanho em (e) corresponde a 10 μm .

Embriões dos grupos F0, F20 e F60 também foram analisados por microscopia confocal 3 h após o tratamento fotossensibilizante visando a análise da distribuição mitocondrial. De acordo com Takeuchi et al. (2005), era esperado que a fotossensibilização afetasse a organização mitocondrial. No entanto, isso não pode ser confirmado uma vez que a distribuição mitocondrial não diferiu entre os tratamentos (Figura 11). Com base nas imagens obtidas, é nítido o efeito da fotossensibilização sobre a intensidade de fluorescência do CMXRos (indicativo de diminuição do $\Delta\psi_m$), embora possa haver um confundimento desse resultado devido ao *photo-bleaching* causado por exposição prolongada à epi-fluorescência. Portanto, esses resultados corroboram achados prévios de que o efeito citotóxico causado pela fotossensibilização com CMXRos é devido a danos mitocondriais causados pela excitação deste cromóforo na mitocôndria, o que resulta em diminuição do $\Delta\psi_m$ e provável morte celular por apoptose.

Figura 11 - Análise do efeito da fotossensibilização com CMXRos sobre o padrão de distribuição mitocondrial

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Zigotos dos grupos F0 (a, b, c), F20 (d, e, f) e F60 s (g, h, i) foram avaliados 3 h após a fotossensibilização em microscópio confocal para análise da distribuição mitocondrial baseado na fluorescência do CMXRos. Não foi observado efeito do tratamento sobre a distribuição das mitocôndrias. Uma objetiva de 100x foi utilizada para obtenção das fotos. A barra de tamanho em (a) corresponde a 10 μ m.

6.3 A TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA FOTOSSENSIBILIZADO NÃO AFETA O DESENVOLVIMENTO À BLASTOCISTO

Com base nos resultados apresentados optou-se por utilizar a fotossensibilização por 20 s (grupo F20) como tratamento fotossensibilizante dos embriões a serem utilizados como doadores de citoplasma. Este tempo de fotossensibilização foi selecionado uma vez que dentre os tempos avaliados, 20 s representou o menor período de fotossensibilização em que há bloqueio total do desenvolvimento à blastocisto. Além disso, o uso de períodos mais prolongados de fotossensibilização resultou em fragmentação celular poucas horas após o tratamento (e.g., 2 a 3 h), o que representaria um entrave à transferência de citoplasma uma vez que esta era realizada por um período de cerca de 6 h após o tratamento fotossensibilizante. Embora agressiva a ponto de resultar em bloqueio completo do desenvolvimento à blastocisto, a fotossensibilização por 20 s não resultou em sinais característicos de morte celular por um período de no mínimo 8 h após o tratamento.

Um total de 102 embriões foram produzidos por transferência de citoplasma, sendo que destes, 58 receberam citoplasma de embriões que não haviam sido fotossensibilizados (TC-F0) e 44 receberam citoplasma de embriões fotossensibilizados por 20 s (TC-F20). Surpreendentemente, os embriões do grupo TC-F20 se desenvolveram à blastocisto com uma taxa de 85,2% (23 blastocistos de um total de 27 embriões). Essa taxa não diferiu da taxa de embriões do grupo TC-F0, sendo esta igual a 92,9% (39 blastocistos de um total de 42 embriões). Além disso, essas taxas também não diferiram da de embriões NZB que foram somente tratados com CMXRos porém não fotossensibilizados (grupo F0; 77,9%, 67 blastocistos de um total de 86 embriões) nem da taxa de embriões B6 que não foram nem tratados com CMXRos nem fotossensibilizados (grupo C; 84,5%, 109 blastocistos de um total de 129 embriões). Por outro lado, embriões NZB que foram tratados com CMXRos e fotossensibilizados por 20 s (grupo F20) se desenvolveram à blastocisto com taxa igual a 5,8% (3 blastocistos de um total de 52 embriões). Portanto, esses resultados confirmam os anteriores de que a fotossensibilização afeta significativamente o desenvolvimento à blastocisto. No entanto, a transferência de citoplasma de embriões fotossensibilizados não afetou o desenvolvimento à blastocisto dos embriões receptores, sugerindo que algum mecanismo nos embriões B6 receptores foi capaz de neutralizar o efeito citotóxico da fotossensibilização.

6.4 A QUANTIDADE DE MTDNA NZB INTRODUZIDO POR TRANSFERÊNCIA DE CITOPLASMA DIMINUI NOS BLASTOCISTOS QUE RECEBEM CITOPLASMA FOTOSSENSIBILIZADO

Uma vez que a fotossensibilização resultou em disfunção mitocondrial, caracterizada entre outros aspectos pelo colapso do $\Delta\psi_m$, buscou-se investigar o destino das mitocôndrias fotossensibilizadas após transferência de citoplasma. Utilizando os ensaios moleculares descritos acima analisou-se o número de cópias de mtDNA (Figuras 12 e 13) e a heteroplasmia (Figura 14) nos embriões produzidos. A análise realizada imediatamente após a transferência de citoplasma indicou que os zigotos que receberam mtDNA NZB não diferiram entre si quanto ao número de cópias de mtDNA total (365.022 ± 33.062 vs. 365.704 ± 33.314 , respectivamente para TC-F0 e TC-F20; $P = 0,98$) nem quanto à porcentagem de mtDNA NZB introduzido ($30,8\% \pm 1,73$ vs. $30,6\% \pm 1,73$; $P = 1,00$). O número total de cópias de mtDNA dos embriões produzidos por transferência de citoplasma (TC-F0 e TC-F20) também não diferiu ($P = 0,98$) do número de cópias de embriões do grupos C (348.850 ± 23.696), F0 (375.461 ± 33.388) e F20 (359.852 ± 23.132). Observou-se também que a quantidade de mtDNA variou bastante dentro dos grupos (variação do CV de 28% a 38%), mas mesmo esta variação foi aproximadamente similar entre os grupos. Em resumo, estes resultados indicam que, apesar da introdução de citoplasma NZB, não houve alteração da quantidade total de mtDNA nos embriões B6. Este resultado provavelmente se deveu à remoção de um volume citoplasmático dos embriões B6, equivalente ao volume posteriormente introduzido. Além disso, não houve diferença da quantidade de mtDNA NZB introduzida, independente do embrião doador de citoplasma ter sido fotossensibilizado ou não. Isso indica que não houve alteração na quantidade de mtDNA dos embriões NZB no ínterim entre a fotossensibilização e a transferência de citoplasma. A introdução de quantidades comparáveis de mtDNA NZB também possibilitou que a heteroplasmia fosse comparada entre os grupos no estágio de blastocisto sem o viés devido a introdução de níveis diferentes.

Figura 12 - A transferência de citoplasma NZB não altera o número total de cópias de mtDNA nos zigotos B6

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Zigotos B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) tiveram o número de cópias de mtDNA mensurado imediatamente após a micromanipulação. Para comparação foram também analisados zigotos B6 controle (C) os quais não foram tratados com CMXRos nem fotossensibilizados e embriões NZB fotossensibilizados por 0 (F0) ou 20 s (F20). Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam as médias. Os valores médios não diferiram entre os grupos ($P = 0,98$).

Figura 13 – A transferência de citoplasma fotossensibilizado não afeta o número de cópias de mtDNA entre zigotos e blastocistos

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Embriões B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) tiveram o número de cópias de mtDNA mensurado nos estágios de zigoto e blastocisto. Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam as médias. Os valores médios não diferiram entre os grupos ($P = 0,50$).

A análise dos níveis de mtDNA NZB no blastocistos produzidos por transferência de citoplasma (Figura 14) indicou diminuição ($P = 0,008$) da heteroplasmia nos embriões que receberam citoplasma fotossensibilizado (grupo TC-F20; $24,7\% \pm 1,43$) em relação aos embriões que receberam citoplasma de embriões não expostos à fotossensibilização (grupo TC-F0; $31,4\% \pm 1,43$). Observou-se diminuição da heteroplasmia também nos blastocistos do grupo TC-F20 comparado com zigotos do mesmo grupo experimental ($P = 0,05$). Por outro lado, a heteroplasmia se manteve constante entre zigotos e blastocisto quando considerou-se embriões do grupo TC-F0 ($P = 0,99$). Apesar da diminuição dos níveis de mtDNA NZB nos blastocistos do grupo TC-F20, não houve redução do número total de cópias de mtDNA entre os estágios de zigoto e blastocisto, independente dos embriões terem recebido ou não

citoplasma fotossensibilizado ($P = 0,66$). O número de cópias também não diferiu ($P = 0,48$) entre embriões dos dois grupos experimentais no estágio de blastocisto (336.497 ± 14.551 vs. 371.063 ± 20.054 , respectivamente TC-F0 e TC-F20). A comparação do número de cópias de mtDNA no estágio de blastocisto entre embriões que sofreram transferência de citoplasma e os demais controles (C, F0 e F20) também não resultou em diferença estatística (Figura 15). Em resumo, esses resultados indicam uma diminuição da heteroplasmia nos blastocistos que receberam citoplasma fotossensibilizado (TC-F20). Uma vez que a quantidade total de mtDNA se manteve em todos os grupos ao longo do desenvolvimento à blastocisto, esses resultados sugerem uma destruição seletiva do mtDNA NZB derivado de embriões fotossensibilizados.

Figura 14 - A transferência de citoplasma fotossensibilizado resulta em diminuição dos níveis de mtDNA NZB no estágio de blastocisto

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Embriões B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) tiveram o nível de mtDNA NZB mensurado nos estágios de zigoto e blastocisto. Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam a média. ^{a,b}Letras diferentes indicam diferença estatística para um mesmo grupo experimental entre estágios ($P = 0,05$). *Diferença entre os grupos experimentais no estágio de blastocisto ($P = 0,008$).

Figura 15 - A transferência de citoplasma fotossensibilizado não afeta o número de cópias de mtDNA em relação a outros grupos no estágio de blastocisto

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Blastocistos B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) tiveram o número de cópias de mtDNA mensurado 96 h após a coleta de embriões. Para comparação também foram analisados blastocistos B6 controle (C) os quais não foram tratados com CMXRos nem fotossensibilizados e embriões NZB fotossensibilizados por 0 s (F0). Uma vez que a fotossensibilização por 20 s bloqueou o desenvolvimento à blastocisto, não foi possível mensurar a quantidade de mtDNA nos embriões do grupo F20. Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam as médias. Os valores médios não diferiram entre os grupos ($P = 0,09$).

6.5 A REDUÇÃO DA HETEROPLASMIA NOS BLASTOCISTOS NÃO É CAUSADA POR ELIMINAÇÃO AUTOFÁGICA DAS MITOCÔNDRIAS INTRODUZIDAS

Para testar se a diminuição da heteroplasmia nos blastocistos estava relacionada com um processo autofágico de destruição mitocondrial (DAI et al., 2014), os embriões produzidos por transferência de citoplasma foram cultivados na presença ou na ausência de rapamicina. Os embriões produzidos por este tratamento foram coletados no estágio de duas células e analisados por imunofluorescência quanto à presença e localização de autofagossomos. Uma vez que as mitocôndrias NZB haviam sido tratadas antes da fotossensibilização com CMXRos, foi possível comparar a localização das mitocôndrias introduzidas em relação à localização dos autofagossomos (Figura 16). Com base nas imagens obtidas por microscopia confocal observou-se um maior acúmulo das mitocôndrias introduzidas num dos blastômeros do embrião. Esse resultado indica que o embrião sofreu clivagem antes de as mitocôndrias NZB serem organizadas no citoplasma do zigoto B6. Com relação à presença de autofagossomos, as imagens obtidas não mostram nenhum indicativo de estímulo autofágico nos embriões que receberam citoplasma fotossensibilizado. Como relatado anteriormente (TSUKAMOTO et al., 2008), os autofagossomos se concentraram na região peri-plasmática dos embriões de ambos os grupos TC-F0 e TC-F20, não sendo possível notar nenhuma diferença entre os grupos com relação à quantidade e localização dos autofagossomos. Os autofagossomos parecem também não se colocalizar com as mitocôndrias NZB em ambos os grupos como analisado pela sobreposição das marcações específicas para ambas as estruturas.

Figura 16 - Análise da ocorrência de mitofagia nos embriões duas células que sofreram transferência de citoplasma de zigotos fotossensibilizados

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Embriões dos grupos TC-F0 (a-d, i-l) e TC-F20 (e-h, m-p) foram cultivados na presença (i-p) ou ausência (a-h) de rapamicina e analisados em microscópio confocal, no estágio de duas células, quanto a presença e localização de mitocôndrias NZB e autofagossomos. As mitocôndrias NZB foram visualizadas pela marcação dos embriões utilizados como doadores de citoplasma com CMXRos (a, e, i, m). Os autofagossomos foram visualizados por imunofluorescência contra a proteína Map1Lc3b (b, f, j, n). As fotos obtidas para cada uma dessas marcações foram sobrepostas para visualização da localização dos autofagossomos em relação às mitocôndrias introduzidas por transferência de citoplasma (c, g, k, o, d, h, l, p). Uma objetiva de 100x foi utilizada para obtenção das fotos, sendo que em (d, h, l, p) foi utilizado uma abertura de 4,8x do pinhole. A barra de tamanho em (a) corresponde a 10 μ m e em (d) a 2 μ m.

Com relação ao tratamento com rapamicina, diferente do esperado este não pareceu estimular a formação de autofagossomos. Pelo contrário, o tratamento com rapamicina pareceu diminuir a quantidade e a intensidade da marcação específica para autofagossomos. A grande maioria dos autofagossomos nos embriões tratados com rapamicina, em ambos os grupos TC-F0 ou TC-F20, também se manteve na região periférica da célula. No entanto, o tratamento com rapamicina pareceu diminuir a quantidade de autofagossomos na região mais interna dos blastômeros se comparado com embriões não tratados com rapamicina. Além disso, assim como constatado anteriormente, o tratamento com rapamicina também não resultou em colocalização de autofagossomos e mitocôndrias NZB, independente dos embriões pertencerem ao grupo TC-F0 ou TC-F20. Portanto, estes resultados não corroboram a suposição anterior de que a redução da heteroplasmia nos blastocistos poderia ser explicada por destruição autofágica das mitocôndrias provenientes de zigotos fotossensibilizados.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos acima, embriões foram novamente produzidos por transferência de citoplasma e cultivados à blastocisto na presença de rapamicina para análise da heteroplasmia e do número de cópias de mtDNA. Diferente do que havia sido verificado na ausência de rapamicina, não foi observada diferença de heteroplasmia ($34,5\% \pm 1,40$ vs. $34,0\% \pm 1,59$; $P = 0,82$) e cópias de mtDNA (233.143 ± 8.882 vs. 252.257 ± 9.653 ; $P = 0,13$) entre os blastocistos dos grupos TC-F0 e TC-F20, respectivamente (Figuras 17 e 18). Portanto, esses resultados indicam que o tratamento com rapamicina não estimula a diminuição dos níveis de mtDNA NZB nos blastocistos, independente da transferência de citoplasma de zigoto fotossensibilizado ou não. Esses resultados corroboram a análise de autofagossomos que sugere não haver eliminação das mitocôndrias introduzidas independente do cultivo na presença ou na ausência de rapamicina.

Figura 17 - O tratamento com rapamicina não afeta o nível de mtDNA NZB nos blastocistos produzidos por transferência de citoplasma

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Zigotos B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) foram cultivados na presença de rapamicina e tiveram o nível de mtDNA NZB mensurado no estágio de blastocisto. Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam as médias. Os valores médios não diferiram entre os grupos ($P = 0,82$).

Figura 18 - O tratamento com rapamicina não afeta o número total de cópias de mtDNA de blastocistos que receberam citoplasma de zigotos NZB

Fonte: (MACHADO, T.S., 2014)

Legenda: Zigotos B6 que receberam citoplasma de zigotos NZB expostos a fotossensibilização por 0 (TC-F0) ou 20 s (TC-F20) foram cultivados na presença de rapamicina e tiveram o número total de cópias de mtDNA mensurado no estágio de blastocisto. Cada quadrado ou círculo indica um embrião e as barras indicam as médias. Os valores médios não diferiram entre os grupos ($P = 0,13$).

DISCUSSÃO

---

7. DISCUSSÃO

Numa primeira fase deste trabalho tinha-se por objetivo o estabelecimento de um tratamento que resultasse em disfunção mitocondrial semelhante ao que se observa nos casos de doenças mitocondriais (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Para tanto, aventou-se diferentes tratamentos que mimetizariam os defeitos mitocondriais causados por mutações no mtDNA. Esse é o caso, por exemplo, do tratamento com CCCP que vem sendo bastante utilizado no estudo das vias autofágicas de eliminação de mitocondriais defeituosas (SCARFFE et al., 2014; TWIG et al., 2008; YOULE; NARENDRA, 2011). Embora grande parte do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares que coordenam as vias de mitofagia seja baseado em estudos com CCCP, alguns autores criticam o uso deste composto uma vez que ele causa despolarização de toda a rede mitocondrial, não sendo de relevância biológica (WANG et al., 2012; YANG; YANG, 2011). Tais autores têm sugerido o uso de metodologias que causem danos mitocondriais mais semelhantes aos que ocorrem *in vivo*. Uma vez que a disfunção mitocondrial está normalmente associada à geração excessiva de EROS, têm-se optado pelo uso de compostos que resultem em danos a organela por estimularem a produção de EROS na mitocôndria (MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; WANG et al., 2012; YANG; YANG, 2011). Além disso, uma vez que o presente trabalho era baseado na transferência de citoplasma, levantou-se a hipótese de que o tratamento dos embriões NZB com CCCP poderia resultar em desacoplamento inespecífico das mitocôndrias B6 (LOU et al., 2007). Embora os embriões NZB pudessem ser lavados em meio sem CCCP antes de serem utilizados para transferência de citoplasma, era possível que níveis residuais deste composto se mantivessem no citoplasma transferido e resultassem em disfunção das mitocôndrias B6.

Baseado nos argumentos acima optou-se pelo tratamento fotossensibilizante como forma de indução de disfunção mitocondrial. Dentre as opções de fotossensibilizadores mitocondriais, o tratamento com CMXRos foi selecionado uma vez que comparado a outros compostos (e.g., MitoTracker Green, rodamina 123, JC-1 e TMRE), o CMXRos se mostrou como o mais potente indutor de danos mitocondrial e celular (LUM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2002; MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS et al., 2004). Devido à sua carga positiva, o CMXRos é atraído seletivamente para a mitocôndria e quando estimulado por luz com comprimento de onda ao redor de 579 nm resulta na produção de EROS (e.g., $^1\text{O}_2$) por transferência de energia para o O_2 . A geração em excesso de EROS na mitocôndria resulta em danos mitocondriais e disfunção da organela (e.g., perda do $\Delta\psi_m$),

semelhante ao que ocorre nos casos de mutações no mtDNA (LUM; MINAMIKAWA; NAGLEY, 2002; MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS et al., 2004). Comparado com o tratamento com CCCP, o CMXRos também tem a vantagem de se ligar a grupos tióis de proteínas mitocondriais, se mantendo assim covalentemente ligado às mitocôndrias NZB após a transferência de citoplasma. Embora tal característica minimize um possível efeito inespecífico da fotossensibilização sobre as mitocôndrias B6, a ocorrência de fusão mitocondrial após a transferência de citoplasma poderia resultar em disfunção inespecífica das mitocôndrias B6.

Uma vez definido o uso do CMXRos, procurou-se então padronizar as condições de fotossensibilização. Com base em trabalhos prévios que haviam utilizado o CMXRos em oócitos e embriões (TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS; TROUNSON; JONES, 2006; THOUAS et al., 2004), inclusive com o objetivo de fotossensibilização, optou-se por utilizar um tratamento padrão que envolveu a incubação dos embriões com 500 nM de CMXRos por 30 min. O tratamento nestas condições parece ser suficiente para que o CMXRos marque seletivamente as mitocôndrias embrionárias conforme evidenciado neste e em outros trabalhos (MINAMIKAWA et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS; TROUNSON; JONES, 2006; THOUAS et al., 2004).

A seguir foi testado o efeito de diferentes doses de fotossensibilização sobre o desenvolvimento dos embriões corados com CMXRos. Foi observada uma associação negativa entre o período de fotossensibilização e a taxa de desenvolvimento à blastocisto, o que corrobora resultados prévios envolvendo a fotossensibilização de oócitos de camundongos. Takeuchi et al. (2005) relataram que a fotossensibilização com CMXRos de oócitos em estágio de vesícula germinativa resultou em bloqueio da maturação nuclear em 94% dos oócitos quando irradiados por período igual ou superior a 10 s. Os autores também relataram que a grande maioria dos oócitos fotossensibilizados demonstraram, poucas horas após o tratamento, sinais de agrupamento e inchamento mitocondrial, redução do $\Delta\psi_m$, formação de corpos apoptóticos e indícios de degeneração (TAKEUCHI et al., 2005). Baseado também na fotossensibilização de oócitos, porém com rodamina 123, Thouas et al. (2006; 2004) relataram que o tratamento resultou em diminuição de vários parâmetros associados às mitocôndria como o $\Delta\psi_m$, a quantidade de ATP e o conteúdo de NADH-NADPH, o que implicou em bloqueio do desenvolvimento pré e pós-implantação, dependendo do período de fotossensibilização utilizado. Resultados semelhantes são descritos no presente trabalho, indicando que os danos celulares causados pela fotossensibilização foram essencialmente os mesmos que os descritos por estes outros autores (MINAMIKAWA

et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2005; THOUAS; TROUNSON; JONES, 2006; THOUAS et al., 2004). Portanto, em conjunto esses resultados indicam que a fotossensibilização resultou em disfunção da mitocôndria, o que deu suporte para o seu uso nos experimentos de transferência de citoplasma que se seguiram. Além disso, uma vez que a fotossensibilização por 20 s resultou em bloqueio completo do desenvolvimento, porém sem degeneração aparente após as primeiras horas do tratamento, esta condição foi a escolhida para ser utilizada nos experimentos de transferência de citoplasma.

Com o intuito de avaliar se a transferência de mitocôndrias disfuncionais afeta o desenvolvimento ou o destino das mitocôndrias introduzidas, zigotos NZB foram fotossensibilizados antes da transferência de citoplasma para zigotos B6. Surpreendentemente, o citoplasma introduzido não resultou em dano ao desenvolvimento à blastocisto como evidenciado por comparação com controles. A porcentagem de mtDNA NZB, no entanto, diminuiu de $30,6\% \pm 1,73$ para $24,7\% \pm 1,43$ nos embriões que receberam citoplasma fotossensibilizado, enquanto que os níveis de mtDNA NZB se mantiveram nos embriões que receberam citoplasma não fotossensibilizado ($30,8\% \pm 1,73$ vs. $31,4\% \pm 1,43$, respectivamente para zigotos e blastocistos). Portanto, esses resultados corroboram a hipótese inicial deste projeto de que mitocôndrias disfuncionais são eliminadas durante o desenvolvimento pré-implantação. A manutenção do número total de cópias de mtDNA indicou ainda que não houve diluição do mtDNA NZB por simples replicação preferencial do mtDNA B6 (FERREIRA et al., 2010; MEIRELLES; SMITH, 1998), mas que o mtDNA NZB foi possivelmente destruído e substituído em mesma proporção por mtDNA B6.

Esses resultados corroboram relatos anteriores com modelos animais e humanos e sugerem que mutações que causam grave defeito na função mitocondrial não são passadas para as gerações seguintes (FAN et al., 2008; FREYER et al., 2012; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008a, 2008b). Nos últimos anos, uma série de estudos com drosófilas e camundongos forneceu evidências de uma seleção purificadora atuando na linhagem germinativa com o objetivo de eliminar mutações no mtDNA (FAN et al., 2008; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; LEE et al., 2012; MA; XU; O'FARRELL, 2014; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008a, 2008b). De acordo com alguns desses relatos, enquanto os níveis das mutações se mantêm constantes ou até mesmo aumentam em tecidos somáticos, nos oócitos eles diminuem, num mesmo animal, em função da idade, resultando em descendentes livres da mutação depois de algumas crias. Foram sugeridos uma série de mecanismos que poderiam explicar esses achados, mas esses ainda carecem de comprovação. Algumas evidências apontam que a seleção ocorreria durante o crescimento do oócito,

momento em que a quantidade de mtDNA no gameta aumenta exponencialmente e a seleção das moléculas replicantes poderia resultar em drásticas mudanças na heteroplasmia (HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). De acordo com um trabalho recente realizado com drosófilas (HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014), a existência de somente um mtDNA por organela nos oócitos resulta em efeito direto da mutação sobre a função mitocondrial. Neste caso, as mitocôndrias funcionais seriam mais eficientes para replicação do mtDNA, levando a diminuição da mutação nos oócitos, e sua consequente eliminação nas gerações futuras.

Embora os achados acima forneçam um provável mecanismo de seleção, outros mecanismos também poderiam contribuir para a eliminação de mutações no mtDNA. O acúmulo de evidências de que células em cultivo são capazes de eliminarem mitocôndrias disfuncionais por mitofagia sugere que este poderia ser mais um mecanismo atuante na linhagem germinativa. Inúmeros trabalhos têm caracterizado o mecanismo molecular de eliminação por mitofagia, o qual está associado aos processos de fusão e fissão mitocondrial (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2008, 2010; SCARFFE et al., 2014; SUEN et al., 2010; TWIG et al., 2008; YOULE; NARENDRA, 2011). A fissão mitocondrial parece ser importante para segregar mtDNAs mutantes e selvagens, e por resultar em organelas de menor tamanho que podem ser englobadas por autofagossomos (TWIG et al., 2008). A fusão mitocondrial, por outro lado, resulta no aumento de tamanho das mitocôndrias e na mistura dos seus conteúdos, o que possibilita a complementação mitocondrial e minimiza o efeito de mutações sobre a função da organela (BUSCH; KOWALD; SPELBRINK, 2014). Neste sentido, num dos primeiros estágios da mitofagia proteínas importantes para a fusão mitocondrial (e.g., Mfn1 e Mfn2) devem ser destruídas nos proteossomos (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2008, 2010; SCARFFE et al., 2014; SUEN et al., 2010; TWIG et al., 2008; YOULE; NARENDRA, 2011). Esses achados estão em consonância com a presença de dezenas de milhares de mitocôndrias nos oócitos, provavelmente devido ao bloqueio da capacidade de fusão mitocondrial (CAO et al., 2007; CREE et al., 2008; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Este panorama mantém o número de mtDNA por mitocôndria baixo no embrião, pelo menos nos primeiros estágios após a fecundação, quando inclusive o mtDNA não é replicado. A inexistência de fusão e replicação mitocondrial contribui para a segregação das organelas no embrião em desenvolvimento, possibilitando que somente um pequeno grupo de mtDNAs povoe a linhagem germinativa.

O contexto apresentado acima parece propício para a ocorrência de mitofagia que

eliminaria mutações que escapariam à seleção durante a oogênese. A presença de somente um mtDNA por organela favoreceria a eliminação de mutações pelo efeito dessas na função da organela. Esta hipótese corrobora os resultados encontrados neste trabalho de que mitocôndrias disfuncionais introduzidas por transferência de citoplasma são destruídas durante o desenvolvimento à blastocisto. Estes resultados também estão de acordo com um recente relato feito por Freyer et al. (2012) de que uma deleção pontual no mtDNA seria eliminada no embrião em desenvolvimento. Os autores observaram que nenhuma seleção ocorreu durante a oogênese, resultando em oócitos heteroplásmicos que foram produzidos por segregação estocástica. Apesar dessa observação, a quantidade de mtDNA mutante nos descendentes diminuiu, embora não tenha sido significativamente diferente entre distintos tecidos, sugerindo que algum mecanismo de seleção tenha atuado durante o desenvolvimento embrionário inicial, antes que as primeiras diferenciações celulares começassem a ocorrer (FREYER et al., 2012). Com base nestes argumentos, os embriões produzidos no presente trabalho por transferência de citoplasma foram investigados quanto a ocorrência de autofagia que eliminaria as mitocôndrias fotossensibilizadas. No entanto, não foi possível verificar uma colocalização de autofagossomos e das mitocondriais introduzidas, independente de terem sido fotossensibilizadas ou não. Um estímulo autofágico induzido por tratamento com rapamicina também não alterou este cenário, além de resultar em blastocistos que embora tivessem recebido mitocôndrias fotossensibilizadas não diferiam de embriões controle quanto ao nível de mtDNA introduzido.

Os resultados acima sugerem que o tratamento com rapamicina resultou em reversão de um possível evento autofágico de destruição das mitocôndrias disfuncionais introduzidas por transferência de citoplasma. Esses resultados eram inesperados e são difíceis de serem explicados. O tratamento com rapamicina deveria inibir a atividade de cinase do complexo mTORC1, estimulando a formação de autofagossomos e a ocorrência de autofagia (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; NARENDRA et al., 2008, 2010; SCARFFE et al., 2014; SUEN et al., 2010; TWIG et al., 2008; YOULE; NARENDRA, 2011). Em trabalhos com híbridos contendo mutações no mtDNA, o tratamento com rapamicina resultou na colocalização de autofagossomos com mitocôndrias com baixo $\Delta\psi_m$, redução da heteroplasmia e restauração parcial dos níveis de ATP (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; SUEN et al., 2010). Era esperado que o tratamento com rapamicina resultasse numa diminuição pronunciada dos níveis de mtDNA NZB nos embriões que receberam citoplasma fotossensibilizado. No entanto, um trabalho recente forneceu evidências de que a autofagia em embriões de camundongos independe do efeito inibitório do mTORC1 (YAMAMOTO;

MIZUSHIMA; TSUKAMOTO, 2014), sugerindo que no presente estudo o tratamento não deveria ter resultado em estímulo autofágico. No entanto, isso não explica os níveis equivalentes de mtDNA NZB observado entre os embriões que receberam citoplasma exposto ou não ao tratamento fotossensibilizante. Uma possível explicação seria a transferência de uma menor quantidade de mitocôndrias nos zigotos que receberam citoplasma fotossensibilizado. No entanto, esta hipótese é bastante improvável uma vez que o volume das biópsias citoplasmáticas foi cuidadosamente mensurado durante o procedimento de micromanipulação.

Novas análises envolvendo a repetição dos experimentos já realizados e a transferência dos embriões heteroplásmicos para receptoras deverão contribuir para uma melhor compreensão dos achados obtidos até o momento. Espera-se que a eliminação das mitocôndrias disfuncionais durante o desenvolvimento pré-implantação resulte em baixos níveis de mtDNA NZB pós-natal.

CONCLUSÕES

---

8 CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da transferência de citoplasma fotossensibilizado em zigotos com relação às taxas de desenvolvimento, número de cópias de mtDNA e heteroplasmia mitocondrial. Assim, foi possível obter as seguintes conclusões:

No que concerne à determinação das condições de fotossensibilização dos zigotos para obtenção de mitocôndrias disfuncionais (fase I):

- Nas condições experimentais deste estudo a fotossensibilização de embriões tratados com CMXRos causa disfunção mitocondrial, como indicado por uma aparente diminuição do $\Delta\psi_m$, resultando em bloqueio do desenvolvimento à blastocisto.

No que concerne à determinação do efeito da transferência de citoplasma fotossensibilizado sobre a taxa de blastocisto, número de cópias de mtDNA e heteroplasmia mitocondrial (fase II):

- A transferência de citoplasma fotossensibilizado não afeta a taxa de desenvolvimento a blastocisto dos embriões receptores.
- A transferência de citoplasma fotossensibilizado não afeta o número de cópias de mtDNA entre zigotos e blastocistos.
- A transferência de citoplasma fotossensibilizado resulta em diminuição dos níveis de mtDNA NZB nos blastocisto.

No que concerne ao envolvimento de processos autofágicos na eliminação das mitocôndrias introduzidas (fase III):

- Possivelmente a redução do mtDNA NZB nos blastocistos não deva ser causada por eliminação autofágica das mitocôndrias introduzidas.
- Nas condições experimentais deste estudo, o tratamento com rapamicina reverteu a diminuição do nível de mtDNA NZB nos blastocistos.

Conclui-se, portanto, que em acordo com a hipótese inicial deste trabalho o embrião de camundongos é capaz de eliminar mitocôndrias disfuncionais durante o desenvolvimento pré-implantação. Tal mecanismo poderia contribuir para a seleção negativa de mutações no mtDNA na linhagem germinativa de camundongos e humanos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AIKEN, C. E.; CINDROVA-DAVIES, T.; JOHNSON, M. H. Variations in mouse mitochondrial DNA copy number from fertilization to birth are associated with oxidative stress. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 17, n. 6, p. 806-813, 2008.

AL RAWI, S.; LOUVET-VALLÉE, S.; DJEDDI, A.; SACHSE, M.; CULETTO, E.; HAJJAR, C.; BOYD, L.; LEGOUIS, R.; GALY, V. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1144-7, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. In: **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.

ASHLEY, M. V; LAIPIS, P. J.; HAUSWIRTH, W. W. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 7325-7331, 1989.

BOGENHAGEN, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, n. 9-10, p. 914-20, 2012.

BROWN, D. T.; SAMUELS, D. C.; MICHAEL, E. M.; TURNBULL, D. M.; CHINNERY, P. F. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 2, p. 533-536, 2001.

BUSCH, K. B; KOWALD, A; SPELBRINK, J. N. Quality matters : how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, Series B: Biological Sciences, v. 369, n.1646, 2014. Não paginado.

CAO, L.; SHITARA, H.; HORII, T.; NAGAO, Y.; IMAI, H.; ABE, K.; HARA, T.; HAYASHI, J.; YONEKAWA, H. The Mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 386-90, 2007.

CAO, L.; SHITARA, H.; SUGIMOTO, M.; HAYASHI, J.; ABE, K.; YONEKAWA, H. New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early primordial germ cells of mice. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000756, 2009.

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F.V.; WELLS, D.; POULTON, J. Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 820-828, 2011.

CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 1-2, 2010.

CREE, L. M.; SAMUELS, D. C.; LOPES, S. C. S.; RAJASIMHA, H. K.; WONNAPINIJ, P.; MANN, J. R.; DAHL, H. M.; CHINNERY, P. F. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 2, p. 249-54, 2008.

CREE, L. M.; SAMUELS, D. C.; CHINNERY, P. F. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 12, p. 1097-102, 2009.

DAI, Y.; ZHENG, K.; CLARK, J.; SWERDLOW, R. H.; PULST, S. M.; SUTTON, J. P.; SHINOBU, L. A.; SIMON, D. K. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 3, p. 637-47, 2014.

EKERT, B. Effect of γ -rays on Thymine in De-aerated Aqueous Solutions. **Nature**, v. 194, n. 4825, p. 278-279, 1962.

ERBACH, G. T.; LAWITTS, J. A.; PAPAIOANNOU, V. E.; BIGGERS, J. D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 5, p. 1027-33, 1994.

FALKENBERG, M.; LARSSON, N.-G.; GUSTAFSSON, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 679-99, 2007.

FAN, W.; WAYMIRE, K. G.; NARULA, N.; LI, P.; ROCHER, C.; COSKUN, P.E.; VANNAN, M.A.; NARULA, J.; MACGREGOR, G. R.; WALLACE, D. C. A Mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 958-962, 2008.

FERREIRA, C. R.; BURGSTALLER, J.P.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M.; CHIARATTI, M. R.; MÉO, S.C.; MÜLLER, M.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V.; STEINBORN, R. Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 3, p. 563-71, 2010.

FOOTE, C. S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation. **Science**, v. 162, n. 3857, p. 963-970, 1968.

FREYER, C.; CREE, L. M.; MOURIER, A.; STEWART, J. B.; KOOLMEISTER, C.; MILENKOVIC, D.; WAI, T.; FLOROS, V. I.; HAGSTRÖM, E.; CHATZIDAKI, E. E.; WIESNER, R. J.; SAMUELS, D. C.; LARSSON, N. G.; CHINNERY, P. F. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1282-1285, 2012.

GILKERSON, R. W.; VRIES, R. L.; LEBOT, P.; WIKSTROM, J. D.; TORGYEKES, E.; SHIRIHAI, O. S.; PRZEDBORSKI, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 5, p. 978-90, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Wotton-Under-Edge: Clarendon Press, 1985. p. 346.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, n. 3, p. 298 - 300, 1956.

HATTORI, N.; SAIKI, S.; IMAI, Y. Regulation by mitophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 53, p. 147-150, 2014.

HAUSWIRTH, W. W.; VAN DE WALLE, M. J.; LAIPIS, P. J.; OLIVO, P. D. Heterogeneous mitochondrial DNA D-loop sequences in bovine tissue. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1001-1007, 1984.

HAUSWIRTH, W. W.; LAIPIS, P. J. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 15, p. 4686-90, 1982.

HILL, J. H.; CHEN, Z.; XU, H. Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. **Nature Genetics**, v. 46, n. 4, p. 389-92, 2014.

INOUE, K.; NAKADA, K.; OGURA, A.; ISOBE, K.; GOTO, Y.; NONAKA, I.; HAYASHI, J. I. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. **Nature Genetics**, v. 26, n. 2, p. 176-181, 2000.

JACOBS, L. J.; WERT, G.; GERAEDTS, J. P.; COO, I. F.; SMEETS, H. J. The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 2, p. 119-136, 2006.

JANSEN, R. P. S. Origin and persistence of the mitochondrial genome. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1–10, 2000. Supplement, 2.

JANSEN, R. P. S.; DE BOER, K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 81-88, 1998.

JENUTH, J. P.; PETERSON, A. C.; FU, K.; SHOUBRIDGE, E. A. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 14, n. 2, p. 146-151, 1996.

KOEHLER, C. M.; LINDBERG, G. L.; BROWN, D. R.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A.E.; MAYFIELD, J. E.; MYERS, A. M. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. **Genetics**, v. 129, n. 1, p. 247-255, 1991.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-43, 2009.

LAIPIS, P. J.; VAN DE WALLE, M. J.; HAUSWIRTH, W. W. Unequal partitioning of bovine mitochondrial genotypes among siblings. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8107-8110, 1988.

LARSSON, N.-G. Introduction: Euromit VII--summarizing 50 years of research on mitochondrial disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, n. 2, p. 170-3, 2009.

LARSSON, N.-G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 683-706, 2010.

LEE, H.-S.; MA, H.; JUANES, R. C.; TACHIBANA, M.; SPARMAN, M.; WOODWARD, J.; RAMSEY, C.; XU, J.; KANG, E. J.; AMATO, P.; MAIR, G.; STEINBORN, R.; MITALIPOV, S. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. **Cell Reports**, v. 1, n. 5, p. 506–15, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. In: _____. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2010. 1304 p.

LIM, M. L.; MINAMIKAWA, T.; NAGLEY, P. The protonophore CCCP induces mitochondrial permeability transition without cytochrome c release in human osteosarcoma cells. **FEBS Letters**, v. 503, n. 1, p. 69-74, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LOTT, M. **Mitomap figures**. Disponível em:
<<http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MitomapFigures>>. Acesso em: 6 jun. 2014.

LOU, P.-H.; HANSEN, B. S.; OLSEN, P. H.; TULLIN, S.; MURPHY, M. P.; BRAND, M.D. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. **The Biochemical Journal**, v. 407, n. 1, p. 129-40, 2007.

LUM, M.-G.; MINAMIKAWA, T.; NAGLEY, P. Microscopic photosensitization: a new tool to investigate the role of mitochondria in cell death. **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 1198-208, 2002.

MA, H.; XU, H.; O'FARRELL, P. H. Transmission of mitochondrial mutations and action of purifying selection in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics**, v. 46, n. 4, p. 393-7, 2014.

MAY-PANLOUP, P. CHRETIEN, M.F.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, n. 06, p. 51-83, 2007.

MEIRELLES, F.; SMITH, L. Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos. **Genetics**, n. 148, p. 877-883, 1998.

MEIRELLES, F. V; SMITH, L. C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. **Genetics**, v. 145, n. 2, p. 445-51, 1997.

MICHAELS, G. S.; HAUSWIRTH, W. W.; LAIPIS, P. J. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. **Developmental Biology**, v. 94, n. 1, p. 246-51, 1982.

MINAMIKAWA, T.; SRIRATANA, A.; WILLIAMS, D. A.; BOWSER, D. N.; HILL, J. S.; NAGLEY, P. Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, pt. 1, p. 2419-30, 1999.

NAGY, A.; BEHRINGER, R.; GERTSENSTEIN, M.; NAGY, K. V. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. In: _____. **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. 764 p.

NARENDRA, D.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; YOULE, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **The Journal of cell biology**, v. 183, n. 5, p. 795-803, 2008.

NARENDRA, D. P.; JIN, S.M.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; GAUTIER, C. A.; SHEN, J.; COOKSON, M. R.; YOULE, R. J. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. **PLoS Biology**, v. 8, n. 1, p. e1000298, 2010.

NASS, M. M.; NASS, S. Intramitochondrial Fibers With Dna Characteristics: I. Fixation and Electron Staining Reactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 593–611, 1963a.

NASS, S.; NASS, M. M. Intramitochondrial Fibers With Dna Characteristics: II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. **The Journal of Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 613-629, 1963b.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, 1989.

OGILBY, P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 3181-209, 2010.

OLIVO, P. D.; VAN DE WALLE, M. J.; LAIPIS, P. J.; HAUSWIRTH, W. W. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. **Nature**, v. 306, n. 5941, p. 400-402, 1983.

PIKÓ, L.; CHASE, D. G. Role of the mitochondrial genome during early development in mice. Effects of ethidium bromide and chloramphenicol. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 357-78, 1973.

PIKÓ, L.; TAYLOR, K. D. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. **Developmental Biology**, v. 123, n. 2, p. 364–374, 1987.

POULTON, J.; KENNEDY, S.; OAKESHOTT, P.; WELLS, D. Preventing transmission of maternally inherited mitochondrial DNA diseases. **BMJ**, v. 338, p. b94, 2009.

POULTON, J.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; KENNEDY, S.; WELLS, D.; HOLT, I. J. Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, P. e1001066, 2010.

POULTON, J.; MARCHINGTON, D. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 751-755, 2002.

SATO, A.; NAKADA, K.; SHITARA, H.; KASAHARA, A.; YONEKAWA, H.; HAYASHI, J. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. **Genetics**, v. 177, n. 4, p. 2031-7, 2007.

SCARFFE, L. A.; STEVENS, D. A.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 6, p. 315-24, 2014.

SCHON, E. A.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 12, p. 878-90, 2012.

SHADEL, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annual Review of Biochemistry**, 66, p. 409-435, 1997.

SHITARA, H.; KANEDA, H.; SATO, A.; INOUE, K.; OGURA, A.; YONEKAWA, H.; HAYASHI, J. I. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. **Genetics**, v. 156, n. 3, p. 1277-84, 2000.

SHOUBRIDGE, E. A. Asexual healing. **Nature**, v. 461, n. Sept., p. 354–355, 2009.

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 87-111, 2007.

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Medicine. Sidestepping mutational meltdown. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 914-915, 2008.

STEWART, J. B.; FREYER, C.; ELSON, J. L.; WREDENBERG, A.; CANSU, Z.; TRIFUNOVIC, A.; LARSSON, N. G. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 63-71, 2008a.

STEWART, J. B.; FREYER, C.; ELSON, J. L.; LARSSON, N. G. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 9, p. 657–62, 2008b.

SUEN, D.-F.; NARENDRA, D. P.; TANAKA, A.; MANFREDI, G.; YOULE, R. J. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11835-40, 2010.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R. D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 371-372, 1999.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R. D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 582–590, 2000.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1410, n. 2, p. 103-23, 1999.

TAKEUCHI, T.; NERI, Q. V.; KATAGIRI, Y.; ROSENWAKS, Z.; PALERMO, G. D. Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 584-92, 2005.

TANAKA, A.; CLELAND, M. M.; XU, S.; NARENDRA, D. P.; SUEN, D.F.; KARBOWSKI, M.; YOULE, R. J. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 7, p. 1367-80, 2010.

THOUAS, G. A.; TROUNSON, A. O.; WOLVETANG, E. J.; JONES, G. M. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1936-42, 2004.

THOUAS, G. A.; TROUNSON, A. O.; JONES, G. M. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 5, p. 969-77, 2006.

THUNDATHIL, J.; FILION, F.; SMITH, L. C. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 4, p. 405-13, 2005.

TILLY, J. L.; TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 242–252, 1995.

TSUKAMOTO, S.; KUMA, A.; MURAKAMI, M.; KISHI, C.; YAMAMOTO, A.; MIZUSHIMA, N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 117-20, 2008.

TSUKAMOTO, S.; KUMA, A.; MIZUSHIMA, N. The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. **Autophagy**, v. 4, n. 8, p. 1076-1078, 2008.

TWIG, G.; ELORZA, A.; MOLINA, A. J.; MOHAMED, H.; WIKSTROM, J. D.; WALZER, G.; STILES, L.; HAIGH, S. E.; KATZ, S.; LAS, G.; ALROY, J.; WU, M.; PY, B. F.; YUAN, J.; DEENEY, J. T.; CORKEY, B. E.; SHIRIHAI, O. S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433-46, 2008.

TWIG, G.; SHIRIHAI, O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 10, p. 1939-51, 2011.

VRIES, R. L. A.; GILKERSON, R. W.; PRZEDBORSKI, S.; SCHON, E. A. Mitophagy in cells with mtDNA mutations: being sick is not enough. **Autophagy**, p. 699-700, 2012.

WAI, T.; AO, A.; ZHANG, X.; CYR, D.; DUFORT, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 52-62, 2010.

WAI, T.; TEOLI, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1484-8, 2008.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual review of Genetics**, v. 39, p. 359-407, 2005.

WALLACE, D. C.; FAN, W. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. **Genes & Development**, v. 23, n. 15, p. 1714-1736, 2009.

WANG, Y.; NARTISS, Y.; STEIPE, B.; MCQUIBBAN, G. A.; KIM, P. K. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1462-76, 2012.

YAMAMOTO, A.; MIZUSHIMA, N.; TSUKAMOTO, S. Fertilization-Induced Autophagy in Mouse Embryos Is Independent of mTORC1. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 1, p. 7, 2014.

YANG, J.; YANG, W. Spatiotemporally controlled initiation of Parkin-mediated mitophagy within single cells. **Autophagy**, v. 7, n. 10, p. 1230-1238, 2011.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.