LAÍS VICARI DE FIGUEIREDO PESSÔA

# Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção

São Paulo

2012

LAÍS VICARI DE FIGUEIREDO PESSÔA

# Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção

Dissertação 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. Flávio Vieira Meirelles

De acordo:
Orientador

São Paulo
2013

VERSÃO CORRIGIDA

**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.2696
FMVZ

Pessôa, Laís Vicari de Figueiredo
Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção / Laís Vicari de Figueiredo Pessôa. -- 2012.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Co-orientador: Dr. Marcos Roberto Chiaratti.

1. Mitocôndria. 2. Depleção. 3. Repleção. 4. Mesenquimal. 5. Pluripotência. I. Título.

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – ÁREA: ANIMAL

**Processo USP nº: 2012.1.1393.74.3**

**Data de entrada**: 26/10/2012

**Pesquisadores**: Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles

**Currículo(s) do(s) pesquisador(es)**: Todos os pesquisadores envolvidos possuem currículo Lattes e os respectivos links se encontram no projeto enviado em anexo.

## PARECER

Título do Projeto: Controle do número de cópias do mtDNA em células bovinas: um modelo baseado na depleção.

**Apreciação Geral**: O projeto é bastante interessante e inovador nesta área de pesquisa. Os pesquisadores envolvidos pretendem criar um modelo experimental utilizando células mesenquimais adiposas de bovinos cultivadas *in vitro* para estudar em maiores detalhes a replicação mitocondrial. O entendimento deste processo poderá colaborar para o desenvolvimento de terapias de doenças mitocondriais que acometem humanos.

**Introdução**: Projeto bem fundamentado e atual.

**Metodologia**: O projeto utilizará cultura de células mesenquimais isoladas de tecido adiposo de bovinos coletados em abatedouro, as quais passarão por processos rotineiros laboratoriais de cultura, sendo então manipuladas de acordo com os protocolos descritos no projeto.

**Aspectos Éticos**: Todos os processos a serem executados não infligem as normas estabelecidas e recomendadas na Resolução No 592, do CFMV de junho de 1992 e dos Princípios éticos na experimentação animal, do COBEA.

**Outros Comentários**: Nada a comentar.

**Esclarecimentos Necessários**: Nenhum esclarecimento se faz necessário.

**Pelo Comitê de Ética:**

☒ **Aprovado.**

☐ **Considerar em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.**

☐ **Não aprovado.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 6 de 11 de 12.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA

**Folha de Avaliação**

Nome: Pessôa, Laís Vicari de Figueiredo

Título: **Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção**

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. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aninha e Zé, sem os quais nada disso seria possível; as minhas irmãs, pelo incentivo e por me acolherem em horas difíceis e ao Pedro, pela ajuda sem limites. Sem vocês eu não estaria aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho, e de maneira especial:

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles** pela orientação, apoio, confiança em mim depositada, e pelo conhecimento a mim passado durante todo esse período. Obrigada.

Ao meu co-orientador **Dr. Marcos Roberto Chiaratti**, que me ensinou a trabalhar, pesquisar e muito me ajudou.

Ao meu namorado **Pedro**, que fez tanto por mim nesses últimos anos que nem tenho palavras para descrever.

À minha amiga **Fabiana**, pela ajuda incondicional. Sem sua ajuda, não teria terminado este trabalho.

À **Arina,** a quem dei tanto trabalho nesses últimos anos que, se recebesse um real a cada vez que chamei seu nome, já seria milionária.

Aos **Professores Heidge, Caju, Daniele e Ricardo** pela atenção, orientação, ajuda e amizade durante o experimento.

A todos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Morfo-fisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e agregados, **Ligia, Paulinho, André, Simone, Natália, Tiago de Bem, Raquel, Prof. Felipe Perecin, Rodrigo, Juliano, Rafael, Naira, Kelly, Juliana, Mateus, Gabriel, Ana, Reno, Fabi, Vanessa, Yonara, Pamela, Soraya, Lilian, Celina, Mariane, Helena, Nilton, Marcia.** Agradeço pela contribuição de vocês.

A **Capes** pela concessão da bolsa de estudos e a **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres**, pela oportunidade e por proporcionar a realização do Mestrado.

## EPÍGRAFE

"E assim depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar. Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução...”

Walt Disney

# RESUMO

PESSÔA, L. V. F. **Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção.** [Control of mitochondrial DNA copy number in bovine cells: a model based on depletion]. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As mitocôndrias são organelas semiautonômicas, portadoras do próprio DNA, o mtDNA e responsáveis pela produção de energia celular na forma de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa. Atualmente, diferentes tipos de doenças, como distrofias musculares e diversos tipos de câncer, estão associadas à alteração nas moléculas de mtDNA. Na década de 70 um modelo a partir do cultivo celular com brometo de etídio (EtBr) foi desenvolvido com o objetivo de se criar uma linhagem celular depletada de cópias de mtDNA. Desde então os mais variados estudos foram realizados e diversos tipos celulares foram submetidos à depleção do mtDNA. Este projeto teve como objetivos criar um modelo de cultivo celular somático na espécie bovina com depleção de cópias de mtDNA para investigar a resposta da célula a esta condição; avaliar como as células depletadas se comportam na ausência de EtBr, além da utilização destas células no processo de reprogramação celular por indução gênica na tentativa de avaliar o efeito do numero de cópias de mtDNA na indução na espécie bovina. Para tanto foram desenvolvidos três experimentos; Experimento 1- Depleção de mtDNA a partir da utilização do brometo de etídeo; Experimento 2 – Repleção do mtDNA; e Experimento 3 – Utilização de células bovinas depletadas no sistema de reprogramação nuclear. Todos os experimentos foram avaliados quanto a quantidade de cópias de mtDNA e expressão gênica para os genes Bax, Bcl2 e Tfam. Ademais, os experimentos 1 e 2 foram avaliados quanto a viabilidade celular e apenas o experimento 1 foi avaliado quanto ao crescimento e morfologia celular. O experimento 1 foi avaliado durante o cultivo celular nos períodos D0, D4, D7, D10 e D13, com os grupos experimentais controle (EtBr-C) e tratado com 100 ng/mL de brometo de etídio (EtBr-T), quanto a núero de cópias do mtDNA, o grupo EtBr-T diferiu do grupo EtBr-C (P=0,0459), apresentando menor número de cópias de mtDNA; menor taxa crescimento celular (P<0,05), porém sem alteração na morfologia celular, e na expressão dos genes descritos acima. No experimento da repleção, não houve diferença no número de cópias de mtDNA, entre os grupos EtBr-T e EtBr-R, indicativo de que as células atingiram o estado rho 0 ou que necessitam de mais tempo para ativar a replicação do mtDNA; quanto a viabilidade celular, houve diferença entres os grupos, quanto a expressão gênica, com aumento do Bax e do Bcl-2 para o grupo EtBr-T; O grupo EtBr-R

apresentou queda do Bcl-2; para o Tfam houve aumento para o grupo EtBr-T e uma queda para o grupo EtBr-R. Quanto ao experimento 3, não foi possível observar sinais de pluripotência, porém foi detectada uma queda na quantidade de mtDNA dos dois grupos tratados por EtBr (EtBr com e sem Stemcca) e o grupo controle com Stemcca. Para analise de expressão gênica, não houve diferenças entre os grupos em relação ao Tfam. Quanto ao Bax, os grupos controle com Stemcca, controle sem Stemcca e EtBr sem Stemcca não diferiram, e o ultimo também não apresentou diferença quando comparado ao grupo EtBr com Stemcca. Para o Bcl-2, os grupos controle sem Stemcca e EtBr com Stemcca não apresentaram diferenças entre si; o grupo controle sem Stemcca não apresentou diferença quando comparado aos grupos controle com Stemcca e EtBr sem Stemcca. Concluindo, este trabalho no nosso conhecimento, descreve pela primeira vez a produção de células bovinas Rho 0 e discute sobre a relação da função mitocondrial e o processo de reprogramação celular.

Palavras-chave: Mitocôndria. Depleção. Repleção.  Mesenquimal. Pluripotência.

## ABSTRACT

PESSÔA, L. V. F. **Control of mitochondrial DNA copy number in bovine cells: a model based on depletion**. [Controle do número de cópias de DNA mitocondrial em células bovinas: um modelo baseado na depleção]. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mitochondria are semi autonomic organelles which present their own DNA (mtDNA); are in charge of cell energy production as ATP through oxidative phosphorylation. Currently, different types of diseases like muscular distrofy; different types of cancer are associated to alterations of mtDNA molecules. In the 70's a model based on cell culture with ethidium bromide (EtBr) was developed in order to create a cell line depleted of mtDNA. Since then, a variety of studies were realized; diverse cell types were submited to mtDNA depletion. This project had as objective creating a model of somatic cell culture in bovine species with depletion of mtDNA copies, in order to investigate cell response to this condition; to analyze depleted cell behavior in the absence of EtBr, besides using this depleteded cell in a reprogramming cell process by genic induction in order evaluate the effect of the number of mtDNA copies during induction in bovine species. Therefore three experiments were developed: Experiment-1 Depletion of mtDNA using ethidium bromide. Experiment-2 repletion of mtDNA; Experiment-3 usage of depleted bovine cells in reprogramming nuclear system. Cell experiments were analyzed according to the quantity of mtDNA copies; genic expression for Bax, BCl2; Tfam genes. Also, experiments 1; 2 were analyzed on cell viability; only experiment 1 was analyzed regarding cell morphology; growth. Experiment-1 was analyzed during cell culture on periods D0, D4, D7, D10, D13, with control experimental groups (EtBr-C),; treated with 100 ng/mL ethidium bromide (EtBr-T); relating to mtDNA quantification the EtBr-T group differed from EtBr-C (P=0,0459) presenting a smaller number of mtDNA copies; smaller growth rate (P<0,05); although there was no differences on cell morphology as there was also no difference related to genic expression of the previous stated genes. Repletion experiment showed no differences about the number of mtDNA copies between EtBr-T; EtBr-R groups, indicating this cells reached Rho0 state or that they need more time to activate mtDNA replication; about cell viability, there were no differences among the groups; relating to genic expression there was an increase of Bax; BCl-2 for EtBt-T group; EtBr-R group showed decrease of BCl-2; for Tfam there was an increase for EtBr-T group; a decrease for EtBr-R. Relating to Experiment-3 it was impossible to notice signs of pluripotency, but we could see a decrease in the amount of mtDNA in both groups treated

with EtBr (EtBr with; without STEMCCA) as in control group with STEMCCA. Genic expression analysis didn't show differences related to Tfam. Regarding to BAX, both control groups (with; without STEMCCA); EtBr without STEMCCA didn't differ from each other,; the last one also didn't show any difference when compared to EtBt with STEMCCA group. For BCl-2, control group without STEMCCA; EtBr with STEMCCA didn't show differences among each other; control group without SEMCCA didn't show differences when compared to control group with STEMCCA; EtBr without STEMCCA. Concluding, this work, regarding our knowledge, describes for the first time, production of bovine Rho0 cells; debates about the relationship among mitochondrial function; the process of cell reprogramation.

Key-words: Mitochondria. Depletion. Repletion. Mesenchymal. Pluripotency.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

**ACTB:** actina

**ATP**: adenosina tri-fosfato

**Bcl-2**: B cell leukemia/lymphoma 2

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**Etbr**: Brometo de etídio

**IPSc:** célula-tronco de pluripotência induzida

**mtDNA**: DNA mitocondrial

**nDNA**: DNA nuclear

**NRF-1**: fator nuclear respiratório

**OXPHOS**: fosforilação oxidativa

**RNA:** ácido ribonucleico

**TFAM**: fator de transcrição mitocondrial A

**$\rho^o$**: Rho0 – Célula sem mtDNA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Relação dos Primers utilizados nas reações de PCR.....34

Figura 1- representação esquemática do experimento 1.....28
Figura 2- representação esquemática do experimento 2.....29
Figura 3 - representação esquemática do experimento 3.....29
Figura 4- Figura comparando o cultivo celular em função do tempo, entre os grupos Controle (EtBt-C) e tratamento com EtBr (EtBr-T).....37
Figura 5 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 40x dos grupos EtBr-C, EtBr-T após 13 dias em cultivo .....38
Figura 6 - Multiplicação celular média dos grupos EtBr-C e EtBr-T em relação aos dias de cultivo. Pode-se observar que o crescimento celular foi maior para o grupo controle.....39
Figura 7 - Comparação entre os grupos EtBr-T, EtBr-C e EtBr-R considerando o número de cópias de mtDNA durante o experimento de Repleção.....40
Figura 9 - Gráfico exibindo número de cópias de mtDNA das células dos grupos EtBr-C e EtBr-R, durante 12 dias cultivo celular .....41
Figura 10 - Gráfico exibindo dados referentes aos ensaios de MTT, que mostram a viabilidade celular .....42
Figura 11 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 20x dos grupos EtBr-C (A), EtBr-T (B) e EtBr-R (C) durante o ensaio de MTT, antes da leitura pelo espectrofotômetro .....43
Figura 12 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 40x dos grupos Controle sem Stemcca; Controle com Stemcca; EtBr sem Stemcca e EtBr com Stemcca mostrando células sem sinais característicos de pluripotência.....45
Figura 13 - Quantidade de cópias de mtDNA dos grupos Controle sem Stemcca, Controle com Stemcca, EtBr sem Stemcca e EtBr com Stemcca .....45

**SUMÁRIO**


1 Introdução ..... 17
2 Revisão de Literatura ..... 19
2.1 Mitocôndrias ..... 19
2.2 mtDNA e células ρ° ..... 21
2.3 Células-tronco Mesenquimais, Embrionárias e de Pluripotência Induzida ..... 23
3 Hipóteses ..... 25
4 Objetivos ..... 26
4.1 Objetivos Gerais ..... 26
4.2 Objetivos Específicos ..... 26
5 Material e Métodos ..... 27
5.1 Local do experimento ..... 27
5.2 Reagentes e meios ..... 27
5.3 Delineamento experimental ..... 27
5.4 Estabelecimento de linhagem celular ..... 30
5.5 Transdução de vetores pluripotentes e cultivo ..... 31
5.5.1 Produção dos Vetores ..... 31
5.5.2 Cultivo das células transduzidas ..... 31
5.6 Exposição ao Brometo de Etídio ..... 31
5.7 Remoção do EtBr ..... 32
5.8 Determinação do número de Cópias de mtDNA ..... 32
5.9 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT PCR) ..... 33
5.10 Análise dos dados de PCR ..... 34
5.11 Viabilidade Celular por Ensaio de MTT ..... 34
5.12 Análise estatística ..... 35
6 Resultados e Discussão ..... 36
6.1 Experimento 1 ..... 36
6.1.1 Depleção ..... 36
6.1.2 Morfologia das células Depletadas ..... 37
6.1.3 Multiplicação Celular ..... 38
6.1.4 Expressão Genica ..... 39
6.2 Experimento 2 ..... 39
6.2.1 Remoção do EtBr ..... 39
6.2.2 Ensaio de MTT ..... 42

6.2.3 Expressão Genica ..... 43
6.3 Experimento 3 ..... 44
6.3.1 Células induzidas a pluripotência ..... 44
6.3.2 Expressão Genica ..... 46
7 Conclusão ..... 47
REFERÊNCIAS ..... 48
Apêndice ..... 56
Apêndice A - Método de extração de DNA total ..... 57

# 1 INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção energética das células em forma de ATP (ALBERTS et al., 2008). Apresentam herança materna (ANDERSON et al., 1981) e material genético próprio (mtDNA), sendo seu mtDNA o responsável por sintetizar 13 polipeptídios essenciais para a atividade mitocondrial (SHADEL; CLAYTON, 1997). Cada célula apresenta entre 1-10 mitocôndrias, com múltiplas cópias de mtDNA, número relacionado com a capacidade de produção de energia de uma determinada célula (REYNER et al., 2001).

Um dos mecanismos celulares que controlam o número de cópias de mtDNA de uma célula é o fator de transcrição mitocondrial A (TFam; GARSTKA et al., 1994) que é responsável por controlar a transcrição e a replicação mitocondrial (MONTOYA et al., 1997; WEBER et al., 2004). No mtDNA, a ordem dos genes é extraordinariamente preservada entre os vertebrados, porém, a sequência de nucleotídeos e a organização dos elementos regulatórios do mesmo, envolvidos na transcrição e replicação do genoma variam vastamente (SHADEL; CLAYTON, 1997). Uma série de alterações celulares e doenças estão intimamente associadas a mutações nas cópias de mtDNA celular (KING; ATTARDI, 1996; SCARPULLA, 2008). Uma forma de mimetizar *in vitro* estas alterações relacionadas ao número de cópias do mtDNA, é o processo de depleção mitocondrial de células por exposição ao brometo de etídio (EtBr) durante o cultivo celular (NASS, 1970).

O EtBr é uma droga amplamente utilizada em modelos de estudo envolvendo o envelhecimento celular e câncer (VILLA et al., 2012). Segundo Nass, 1970, o brometo de etídio gera depleção no número de cópias de mtDNA na célula, devido a uma interferência na incorporação da timidina ao DNA circular. Células depletadas apresentam ainda mitocôndrias com uma morfologia extremamente particular, sendo maiores que mitocôndrias normais, porém fragmentadas e exibindo uma crista espaçada e mal desenvolvida (NASS, 1970; MARUSICH et al., 1997). Tais características são também observadas em outros tipos celulares, como em células pluripotentes (SATHANANTHAN; PERA; TROUNSON, 2002; RAMALHO-SANTOS et al., 2009; FACUCHO-OLIVEIRA; ST JOHN, 2009).

As células pluripotentes, ou células-tronco embrionárias, possuem um potencial de se diferenciar em qualquer um dos folhetos germinativos embrionário: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme, que por sua vez darão origem a mais de 200 tipos celulares (fetais e/ou adultos) durante todo o desenvolvimento (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981;

THOMSON et al., 1998; NAFEE et al., 2008; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008). Entre estes tipos celulares citados anteriormente, estão às células mesenquimais, que são classificadas como multipotentes, já que as mesmas também possuem um potencial de diferenciação, porém inferior às células-tronco embrionárias. Para que uma linhagem celular possa ser considerada mesenquimal, além de poderem ser encontradas em praticamente todo o organismo (MOSNA; SENSEBE; KRAMPERA, 2010), a mesma deve possuir algumas características particulares, dentre elas, a total capacidade de se diferenciar em adipócitos, condroblastos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006).

A utilização de células-tronco pluripotentes é de extrema importância para o entendimento de estudos relacionados aos mais variados tipos, porém sua aplicação prática esbarra em uma série de dificuldades. Como uma tentativa de solucionar tais problemas, foram desenvolvidas as células-tronco de pluripotência induzida (células iPS) através da transdução retroviral dos fatores OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC no genoma. Estas células passam por um processo de desdiferenciação ou reprogramação nuclear, em que leva de um estado diferenciado a indiferenciado (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Baseado nos fatos citados acima, a intenção do projeto foi estudar os mecanismos responsáveis pelo controle da replicação de mtDNA durante um processo de depleção mediado por EtBr em células mesenquimais. Também foi testado o efeito do EtBr durante o processo de indução de iPS bovinas.

Espera-se deste estudo uma contribuição para o conhecimento dos mecanismos replicacionais do mtDNA, o que pode ter implicações para o entendimento de muitas doenças mitocondriais (POULTON et al., 2010).

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias são comumente caracterizadas como estruturas semelhantes a bactérias, sendo cilíndricas, rígidas e com diâmetro variável (0,5-1µm). São delimitadas por duas membranas que definem dois espaços, o espaço interno da matriz e o espaço intermembranas (ALBERTS et al., 2008), sendo que a membrana externa a delimita e separa do citosol, e a membrana interna, invaginada, forma a crista (TAANMAN, 1998). São organelas celulares consideradas essenciais para a evolução, uma vez que na sua ausência, os organismos dependeriam de glicólise anaeróbia para a produção de adenosina tri-fosfato (ATP; ALBERTS et al., 2008). Apresentam herança materna (ANDERSON et al., 1981) e são compostas por cerca de 1.500 polipeptídios e responsáveis pela produção, através da fosforilação oxidativa (OXPHOS), da maior parte da energia da célula na forma de ATP (REYNER et al., 2001; CHIARATTI et al., 2010).

Enquanto o DNA nuclear (nDNA) codifica a maioria das proteínas da cadeia respiratória e todas as enzimas e proteínas que regulam a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA; JENG et al., 2008), o mtDNA sintetiza 13 polipeptídios componentes da cadeia respiratória (SHADEL; CLAYTON, 1997; CHIARATTI et al., 2010). O material produzido no núcleo é importado via translocases proteicas especializadas da membrana mitocondrial externa, através do citoplasma (ALBERTS et al., 2008). Essa associação dos componentes implica em uma origem genética dupla para os integrantes da OXPHOS e demonstra a complexidade do sistema (MARUSICH et al., 1997).

Apesar da contribuição do mtDNA ser pequena no quadro proteico mitocondrial geral, os 13 componentes produzidos por ele são considerados essenciais para a atividade das mitocôndrias (e.g. OXPHOS; SHADEL; CLAYTON, 1997), além de codificar tRNAs e rRNAs necessários para a tradução dos mRNAs codificados pelo mtDNA. A comunicação núcleo/ mitocôndria, no que diz respeito ao controle da replicação e transcrição do mtDNA é dirigida, principalmente por dois fatores de transcrição: o fator nuclear respiratório (NRF-1) e o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM; MIRANDA et al., 1999).

O TFAM é um componente essencial do complexo de iniciação da transcrição mitocondrial (JENG et al., 2008). É caracterizado como um gene de cópia nuclear única que

regula a replicação e a transcrição do mtDNA (D'ERRICO et al., 2005; CHIARATTI et al., 2010) e é regulado pelo NRF-1, assim como diversos outros genes de atuação mitocondrial (MIRANDA et al., 1999).

O número de copias de mtDNA na célula está relacionado com a capacidade de produção de ATP e essa síntese pode ser comprometida quando o mtDNA sofre mutações (CHIARATTI et al., 2010). Problemas relacionados à ATPase e à cadeia respiratória causam efeitos colaterais em funções celulares e teciduais (MARUSICH et al., 1997) e o baixo número de cópias de mtDNA já foi relacionado com vários tipos de células que apresentavam disfunção mitocondrial e características celulares alteradas. Essa alteração na quantidade de cópias de mtDNA está amplamente associada a distúrbios como carcinoma hepato-celular, câncer renal, estresse oxidativo e cardiomiopatia (JENG et al., 2008), sendo amplo o número de doenças humanas relacionadas a defeitos mitocondriais (KING; ATTARDI, 1996).

O modelo de depleção do DNA em resposta ao tratamento das células em cultivo com Brometo de Etídio (EtBr) é descrito desde os anos 70 (NASS, 1970) e amplamente utilizado em experimentos para avaliação da contribuição do mtDNA em doenças como câncer (LEE; CHANG; CHI, 2010) e no envelhecimento celular (SCHROEDER et al., 2008). De acordo com Nass (1970), células tratadas com EtBr apresentaram menor numero de cópias de mtDNA, com moléculas mais lineares (e não circulares como o mtDNA saudável) quando comparadas com as mesmas células, sem o tratamento. Isso ocorre devido à exposição ao EtBr, que afeta a incorporação de timidina ao DNA circular. Outros estudos também mostram que células com baixa contagem de mtDNA tendem a manifestar resistência a quimioterápicos (OHTA, 2006) e que o DNA mitocondrial tem papel importante na manutenção do fenótipo maligno em células tumorais (VILLA et al., 2012).

A geração de um modelo animal de depleção do mtDNA em bovinos pode ser utilizado para teste de resistência a quimioterápicos, repleção de mtDNA exógeno por fusão de células depletadas (KHAN; SMIGRODZKI; SWERDLOW, 2007) ou mesmo o desenvolvimento de modelos de mutação de mtDNA de forma semelhante as encontradas em doenças relacionadas ao mtDNA. A grande vantagem do sistema não murinho é que ele tem uma vida mais longa, o que permitiria estudos de efeito do tempo e da senescência a semelhança do que ocorre no humano.

As mitocôndrias têm papel importante na homeostase, no metabolismo energético e na morte celular programada (CHIARATTI et al., 2010). A capacidade de fosforilação oxidativa da mitocôndria é determinada por uma associação dos genes mitocondriais e nucleares (JENG et al., 2008), sendo assim, o controle da biogênese e da função mitocondrial é dependente de

um processo extremamente complexo que exige uma variedade de bem orquestrados mecanismos regulatórios (GARESSE; VALLEJO, 2001).

Apesar de relativamente bem compreendido não há até o momento um estudo que tenha caracterizado o controle do número de cópias de mtDNA em uma célula e sua regulação frente à oferta de oxigênio e de substrato, por exemplo.

## 2.2 MTDNA E CÉLULAS P°

As células somáticas de mamíferos apresentam uma enorme variação no número de mitocôndrias, cada uma delas apresentando entre 1-10 cópias de mtDNA (REYNER et al., 2001). Esse número que varia com tipos celulares dependendo da necessidade energética da célula (BROWN; CLAYTON, 2002), um exemplo é o oócito, que apresenta um número muito maior de mitocôndrias que o espermatozoide (DÍEZ-SÁNCHEZ et al., 2003). Esta variação também pode ser observada em relação a idade do animal (SCHWARK; CAVELIER; CORTOPASSI, 2006).

Acredita-se que o mtDNA seja organizado numa estrutura conhecida por nucleóide, um complexo núcleo-protéico composto por fatores envolvidos na regulação da replicação e transcrição do mtDNA e suas múltiplas cópias (CHIARATTI et al., 2010). Existem ainda evidências *in vivo* e *in vitro* que atestam que o TFAM não seja só um participante do processo de transcrição do mtDNA, mas sim um elemento chave desse mecanismo (GARSTKA et al. 1994), sendo essencial para sua manutenção (KANKI et al., 2004), já que controla a transcrição e a replicação mitocondrial (MONTOYA et al., 1997). A descoberta que mutações do mtDNA podem ser patogênicas para os humanos intensificou o interesse em entender o mecanismo de manutenção do mtDNA (SHADEL; CLAYTON, 1997).

Células que não se dividem ou de divisão lenta, como neurônios, apresentam maiores taxas de mutação no mtDNA que células de divisão rápida e esses defeitos mitocondriais estão diretamente relacionados com algumas doenças neuromusculares (BRENNER et al., 1998). Tais defeitos podem ainda contribuir indiretamente com várias outras doenças degenerativas (SCARPULLA, 2008).

Com algumas exceções, a ordem dos genes no mtDNA é notavelmente preservada entre as espécies de vertebrados, entretanto, a sequência de nucleotídeos e a organização dos elementos regulatórios do mtDNA envolvidos na transcrição e replicação do genoma variam

amplamente (SHADEL; CLAYTON, 1997). A transcrição e replicação do mtDNA são passos importantes para a biogênese mitocondrial, entretanto, a regulação desses processos *in vivo* ainda não está totalmente clara (WEBER et al., 2004).

Acredita-se que a expressão e a replicação do mtDNA ocorram através de fatores codificados pelo núcleo e importados para a mitocôndria (BONAWITZ; CLAYTON; SHADEL et al., 2006). Existem dois fatores chaves para o início da replicação do mtDNA: o TFAM e a POLG mitocondrial-específica (LLOYD et al., 2006), que é uma DNA polimerase específica que conduz a replicação do mtDNA (CHIARATTI et al., 2010).

Nos animais vertebrados, a molécula de mtDNA apresenta uma região não codificante que ancora os promotores para dar inicio à transcrição e originar a replicação da fita pesada (*H-strand*) do DNA (SHADEL; CLAYTON, 1997). Nestes animais a transcrição ocorre através de dois promotores adjacentes: o promotor de fita leve (*light strand promoter* - LSP) e o promotor de fita pesada (*heavy strand promoter* - HSP), dependendo de qual serve de molde (GENSLER et al., 2001). O TFAM apresenta alta afinidade com os fatores de promoção da transcrição de ambas as fitas (KANKI et al., 2004). Cada fita de mtDNA circular é transcrita através de uma RNA polimerase do tipo bacteriófago produzindo grandes transcritos policitrônicos que são processados gerando rRNAs, tRNAs e mRNAs maduros, o que permite a expressão de informação genética mitocondrial (SHADEL; CLAYTON, 1997; LEE; CLAYTON, 1998). A replicação do mtDNA está intimamente ligada a sua transcrição. Tem início com um único promotor na fita leve e resulta em uma forma estável de um híbrido de RNA:DNA (BROWN; CLAYTON, 2002) conhecido como *R-Loop* (LEE; CLAYTON, 1998).

Os tratamentos com drogas que levam a depleção do mtDNA como o EtBr, são largamente aplicados nos estudos de função e herança mitocondrial. Aparentemente as drogas agem inibindo o complexo de transcrição/replicação do mtDNA, sem efeito sobre o número de organelas que passam a funcionar sem parte da maquinaria de OXPHOS (KING; ATTARDI, 1996). No entanto tem-se que estas células, desde que suplementadas com uridina, tem capacidade de manutenção *in vitro* de maneira semelhante às células que contem o mtDNA (JENG et al., 2008).

## 2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, EMBRIONÁRIAS E DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA

Mencionadas pela primeira vez na década de 60 (FRIEDENSTEIN et al., 1968), as células-tronco mesenquimais formam um grupo diversificado de células com a capacidade de se diferenciar em variados tipos celulares (STRIOGA et al., 2012). Existem divergências quanto à utilização da expressão *células-tronco* em sua definição, uma vez que esse termo implicaria na multipotência e na capacidade crescer indefinidamente mantendo sua aptidão de se diferenciar nos demais tipos celulares (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

Para que sejam consideradas células mesenquimais, as mesmas devem obedecer certos critérios: aderência à placa em condições padrões de cultivo; diferenciação *in vitro* em adipócitos, condroblastos e osteócitos, mediante estímulos (DOMINICI et al., 2006).

São amplamente distribuídas pelo organismo, podendo ser encontradas em praticamente qualquer órgão (MOSNA; SENSEBE; KRAMPERA, 2010) e como sua obtenção é mais fácil que a de células-tronco embrionárias e IPS, e apresentam menor risco de derivação de tumores, são amplamente utilizadas para a pesquisa (SAMPAIO et al., 2010).

As células-tronco embrionárias são células derivadas das células embrionárias totipotentes de embriões no inicio do desenvolvimento (blastocistos), que apresentam a capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas, além de crescer indefinidamente mantendo sua pluripotência (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1998), além disso, as células-tronco embrionárias apresentam características morfológicas específicas como formato arredondado, núcleo grande e citoplasma escasso (THOMSON et al., 1998; TAKAHASHI*;* YAMANAKA, 2006).

A utilização destas células é de suma importância para a pesquisa relacionada à terapia celular, porém, devido aos problemas éticos relacionados à obtenção das células embrionárias humanas, foi necessário desenvolver outros métodos que gerassem células semelhantes e atuassem da mesma forma. Foi assim que surgiram os estudos relacionados às células IPS.

Como uma tentativa de superar problemas éticos para a obtenção de células tronco embrionárias em 2006, os pesquisadores Takahashi e Yamanaka, da Universidade de Kyoto, realizaram uma grande descoberta para o campo da terapia celular. Baseados no fato que células somáticas poderiam ser reprogramadas através das técnicas de transferência nuclear para oócitos e fusão de células embrionárias com somáticas, eles conjeturaram que havia fatores que apresentavam papel importante na manutenção da identidade das células

embrionárias também seriam de igual importância para a indução de células somáticas à pluripotência. Essa hipótese os guiou ao desenvolvimento de células tronco de pluripotência induzida (células IPS; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Ainda segundo tais resultados, células IPS são células somáticas que apresentam um estado indiferenciado através da transdução retroviral de fatores de indiferenciação (OCT3/4, SOX2, KLF4 e C-MYC- também conhecidos por OSKM) no genoma de camundongos e humanos. Esses fatores foram escolhidos dentre 24 genes selecionados inicialmente por serem importantes para a manutenção da identidade de células tronco embrionárias (MARTIN, 1981; EVANS; KAUFMAN, 1981; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; JAENISCH; YOUNG, 2008).

As células IPS apresentam características semelhantes às células-tronco embrionárias, tais como núcleo grande, formato arredondado e pouco citoplasma, além da capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas. Já foram geradas células IPS das mais variadas espécies, incluindo primatas, ratos, cães, suínos, coelhos, ovinos e equinos (LIU et al., 2008; LI et al., 2009; SHIMADA et al., 2009; WU et al., 2009; HONDA et al., 2010; LI et al., 2011, NAGY et al., 2011) porém a produção de células IPS de bovinos ainda não foi bem sucedida.

As mitocôndrias de células depletadas de mtDNA (células ρ°) apresentam-se aumentadas, porém fragmentadas; enquanto sua crista é espaçada e mal desenvolvida (NASS, 1970; MARUSICH et al., 1997; ARMAND et al., 2004), podendo estar ausente, no caso de tratamento longo com EtBr (NASS, 1970). Neste aspecto, se assemelham às células-tronco embrionárias, uma vez que a análise estrutural de suas mitocôndrias, assim como em células depletadas de mtDNA, suas mitocôndrias se apresentavam escassas e com a crista mitocondrial mal desenvolvida (SATHANANTHAN; PERA; TROUNSON, 2002; RAMALHO-SANTOS et al., 2009; FACUCHO-OLIVEIRA; ST. JOHN, 2009).

# 3 HIPÓTESES

1) É possível obter células depletadas em mais de 90% do seu conteúdo original de mtDNA, capazes de se manter vivas *in vitro*, por tratamento com EtBr;
2) Ocorre, nas células depletadas de mtDNA (grupo EtBr-T), a aumento expressão do TFAM, gene envolvido no controle da replicação e expressão do mtDNA, quando comparadas as células do grupo EtBr-C;
3) Ocorre a diminuição do crescimento celular, da viabilidade celular nas células depletadas de mtDNA (grupo EtBr-T) em relação ao grupo EtBr-C;
4) Há recuperação do número de cópias de mtDNA após a remoção do EtBr do meio de cultivo das células depletadas de mtDNA;
5) A transdução de fatores de reprogramação em células bovinas tratadas com EtBr potencializa o efeito da reprogramação.

# 4 OBJETIVOS

## 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Criar um modelo de cultivo celular somático na espécie bovina com depleção de cópias de mtDNA para investigar a resposta da célula a esta condição.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Estabelecer linhagens de células mesenquimais bovinas depletadas de mtDNA por tratamento com EtBr (Grupo EtBr-T);
2) Remover o EtBr do meio de cultivo das células depletadas para observar a repleção das cópias de mtDNA.
3) Expor células bovinas depletadas de mtDNA por tratamento com ETBR às condições adequadas para a produção de células IPS;

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e do Desenvolvimento (LMMD), no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* de Pirassununga-SP.

## 5.2 REAGENTES E MEIOS

Exceto quando mencionado, reagentes e meios foram adquiridos junto a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). De maneira geral, os procedimentos i*n vitro* foram executados em incubadoras umidificadas mantidas a 38,5ºC, em ar com 5% $CO_2$.

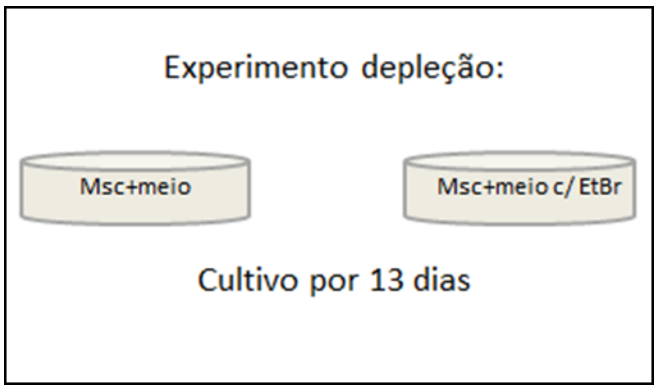
## 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para os experimentos realizados foram utilizadas células mesenquimais bovinas com ou sem adição de EtBr ao meio de cultivo para investigar seus efeitos em relação ao comportamento celular. Os diferentes grupos foram cultivados *in vitro* e o material utilizado para realização das análises propostas no item *Material e Métodos* foi coletado durante os repiques das células, quando foram centrifugados e o pellet obtido foi congelado. Os experimentos realizados estão descritos a seguir. Um esquema resumido encontra-se nas figuras 1 a 3.

**Experimento 1:** Obtenção de células depletadas de mtDNA. Neste experimento $4x10^5$ células mesenquimais foram semeadas em placas de 100mm de diâmetro durante 13 dias, divididas em 2 grupos: grupo controle (EtBr-C) e um grupo tratado com brometo de etídio

(EtBr-T). Repiques foram realizados nos dias 4, 7, 10 e 13e a cada repique gerou dados para análise de crescimento celular e foram coletadas amostras utilizadas para as análises de quantificação de mtDNA e expressão gênica.

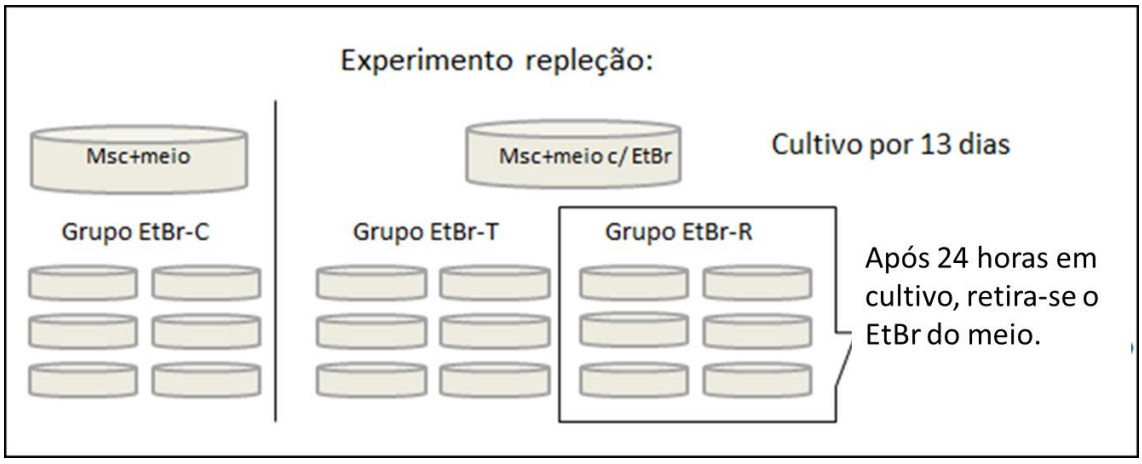
Figura 1- representação esquemática do experimento 1




Fonte: Elaboração própria.

**Experimento 2:** Repleção do mtDNA das células obtidas no experimento 1 através da remoção do EtBr do meio de cultivo. Neste experimento, após os 13 dias de cultivo com EtBr, as células foram repicadas e semeadas em placas de 35mm de diâmetro. As células provenientes do grupo EtBr-C foram plaqueadas em 6 placas enquanto as células do grupo EtBr-T foram plaqueadas em 12 placas, das quais 6 tiveram o meio com EtBr substituído depois de 24 horas (totalizando 14dias de cultivo), por meio igual ao do grupo EtBr-C. A partir deste momento, esse grupo é denominado EtBr-R. Essas células foram coletadas em seis diferentes estágios (0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h) sendo o primeiro ponto o momento em que ocorreu a troca do meio do grupo EtBr-R. Essas amostras foram utilizadas para as análises de quantificação de mtDNA e expressão gênica.

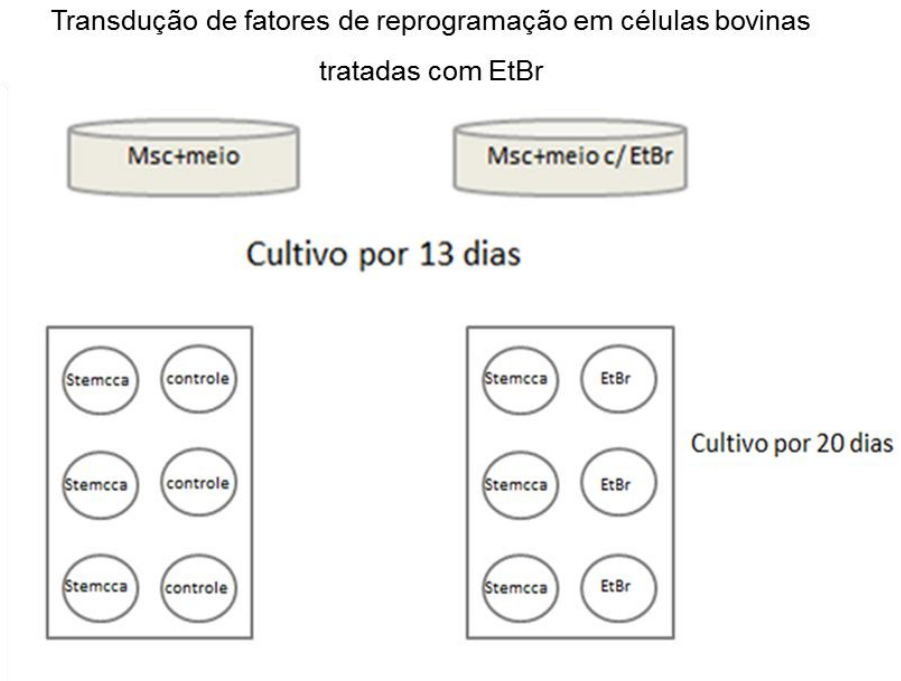
Figura 2- representação esquemática do experimento 2




Fonte: Elaboração própria.

**Experimento 3:** Transdução lentiviral (STEMCCA- que contém os fatores Oct-4; Sox-2; C-Myc e KLF-4) às células depletadas de mtDNA. Neste experimento células mesenquimais previamente tratadas como no experimento 1 foram semeadas em placas de seis poços, separadas em quatro grupos: grupo 1 (controle Stemcca), grupo 2 (controle), grupo 3 (EtBr Stemcca) e grupo 4 (EtBr) e cultivadas por 20 dias. Foram então repicadas e as amostras utilizadas para as análises de quantificação de mtDNA e expressão gênica.

Figura 3 - representação esquemática do experimento 3




Fonte: Elaboração própria.

## 5.4 ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR

As células mesenquimais foram obtidas de tecido adiposo da base da cauda de bovinos adultos. O isolamento e cultivo dessas células foram realizados como descrito previamente (SAMPAIO et al., 2010). De maneira sucinta, um fragmento de tecido adiposo foi coletado imediatamente após abate, de uma fêmea Nelore (*B. indicus*), portadora de marcador de mtDNA *B. indicus*. O tecido foi lavado em solução salina 0,9% fria, contendo 5% de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e reduzido em pequenos fragmentos antes da incubação em 0,001% de colagenase por 3 h.

Após inativação da colagenase com *alpha minimal essential medium* (MEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), o precipitado de células foi ressuspendido em meio de cultivo Eagle Dulbecco modificado (DMEM) (*Life Techonologies*), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/ml de piruvato e 1% de antibiótico e, cultivado em placas de 35 mm de diâmetro a 38,5ºC em atmosfera de 5% de $CO_2$ e máxima umidade (condição padrão da estufa de cultivo). O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias. As células foram repicadas antes de atingirem 90% de confluência e crio-preservadas em várias alíquotas na terceira passagem para serem utilizadas para os tratamentos visando o estudo da depleção e replicação do mtDNA.

Durante os experimentos, incluindo os grupos controle, as células foram cultivadas em placas de 100 mm de diâmetro em IMDM na presença de 10% de SFB, 1% de antibiótico Penicilina/Spectromicina (Gibco), e 50 µg/ml de uridina conforme sugerido por King e Attardi (1996). As células foram contadas em Câmara de Newbauer a cada passagem para avaliação do crescimento celular. Além disso, a morfologia celular foi observada por microscopia óptica a cada passagem quanto ao efeito dos tratamentos.

Durante o experimento preliminar descrito nesta etapa a multiplicação celular foi acompanhada através de três passagens, seguindo o protocolo sugerido por Bruder; Jaiswal; Haynesworth, (1997). Nesse caso $4x10^5$ células foram semeadas em placas de 100mm e repicadas a cada 3 dias.

## 5.5 TRANSDUÇÃO DE VETORES PLURIPOTENTES E CULTIVO

### 5.5.1 Produção dos Vetores

Os vetores plasmidiais STEMCCA foram previamente preparados e cedidos pelo LMMD.

### 5.5.2 Cultivo das células transduzidas

As células transduzidas foram previamente cultivadas durante 13 dias em meio IMDM na presença de 10% de SFB, 1% de antibiótico Penicilina/Streptromicina (Gibco), e 50 µg/ml de Uridina, exatamente nas mesmas condições que as células dos demais experimentos, na presença (grupo EtBr) ou ausência (grupo controle) de brometo de etídio. Após este período, as células foram transferidas para um cultivo na presença de monocamada de fibroblastos murinos fetais (MEFs) mitoticamente inativados por mitomicina-C em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 20% KO-Serum Replacement (Invitrogen), 2mM Glutamina (Invitrogen), 1% *non-essential amino acids* (Invitrogen), 0.055mM beta-mercaptoetanol (Invitrogen), 10ng/mL bFGF (Sigma) e antibióticos, ainda na presença ou ausência de bromento de etídio.

## 5.6 EXPOSIÇÃO AO BROMETO DE ETÍDIO

Nesta etapa experimental as linhagens celulares foram divididas em dois grupos; Controle (EtBr-C – sem adição de EtBr ao meio de cultivo) e Brometo (EtBr-T – na presença de EtBr no meio de cultivo). Os grupos foram cultivados simultaneamente sob as mesmas condições de cultivo descritas no item para estabelecimento de linhagem celular, porém com adição de uridina ao meio de cultivo (50 µg/ml).

Para definição da concentração a ser utilizada durante o experimento de depleção mitocondrial, um experimento preliminar foi desenvolvido com diferentes concentrações de EtBr (50, 100, 200 e 400 ng/mL) sendo submetidas a cinco passagens, conforme sugerido por King e Attardi (1996).

A primeira e a segunda passagens foram realizadas a cada 72h. A partir da terceira passagem, devido ao efeito do EtBr no crescimento celular (KING; ATTARDI, 1996), as células foram repicadas a cada 168h.

As doses de EtBr utilizadas foram avaliadas quanto a sua eficiência de depleção e efeito no crescimento celular. A dose mais eficiente e com menor efeito no crescimento celular foi escolhida para os tratamentos subsequentes. As células tratadas (EtBr-T) e do grupo controle (EtBr-C) foram expandidas e crio-preservadas em várias alíquotas numa mesma passagem celular para uso nos demais experimentos.

Após analise dos dados obtidos, a dose de EtBr selecionada foi a de 100ng/ml. Nesse caso $4.0x10^5$ células foram semeadas em placas de 100 mm e replaqueadas a cada 3 dias. As células foram expostas ao tratamento por 13 dias a partir do dia seguinte ao que foram semeadas, para que pudesse aderir à placa de cultivo, e a cada passagem foram colhidas amostras utilizadas para as análises do experimento.

## 5.7 REMOÇÃO DO ETBR

Ao final dos 13 dias de tratamento com EtBr, as células cultivadas do grupo EtBr-C foram repicadas e semeadas em 6 placas com 35mm de diâmetro enquanto as células do grupo EtBr-T foram semeadas em 12 placas $5.13x\ 10^4$ células Após 48 horas em cultivo, o meio de seis placas originadas do grupo EtBr-T foi trocado por meio idêntico ao do controle, formando um novo grupo chamado de “Repleção” (EtBr-R).

A partir do momento da troca de meio (chamado de 0 hora) foram efetuadas coletas de grupos de placas formados por 1 placa EtBr-C, 1 placa EtBr-T e 1 placa EtBr-R nos intervalos de 0 hora  3 horas, 6 horas, 12 horas 24 horas e 48 horas. Em cada um destes pontos foram colhidas amostras utilizadas para determinação do numero de cópias de mtDNA e para análise de expressão gênica.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA

O número de cópias de mtDNA será estimado a cada passagem celular como descrito previamente (NICKLAS et al., 2004). Resumidamente, as amostras armazenadas foram submetidas ao método de extração total de DNA a base de NaCl seguindo protocolo (anexo 1), previamente padronizado pelo grupo, e quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000) e armazenadas em *freezer* -80ºC. Os ensaios para quantificação de mtDNA foram realizados em termociclador para PCR em Tempo Real (Applied Biosystems, 7500 Fast Real Time PCR System; Foster City, CA, EUA) utilizando o sistema TaqMan® Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicatas utilizando como controle endógeno o gene da beta actina (ACTB).

## 5.9 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT PCR)

Para tal procedimento as amostras de células foram peletizadas e armazenadas em *freezer* -80ºC. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de extração de RNA total por meio do protocolo utilizando o reagente TRYzol® (Invitrogen), seguindo metodologia do fabricante para extração de material biológico do tipo células peletizadas. O RNA extraído foi submetido à transcrição reversa utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo orientações do fabricante. As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Fast Real Time PCR System; Foster City, CA, EUA). Nas reações para quantificação relativa dos genes selecionados (Bax, Bcl2 e Tfam; Quadro 1) e o controle endógeno (Actb), foi utilizado o sistema SYBR® Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em reação de 20µL. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi avaliada em duplicata para todos os genes em todas as reações.

Quadro 1- Relação dos Primers utilizados nas reações de PCR

| Target Assay | Primer ou probe | Sequência | Produto |
|---|---|---|---|
| (Genbank) | | (5'-3') | (bp) |
| *ACTB* | ACTB-f | GGCACCCAGCACAATGAAGA | 67 |
| (NM_173979.3) | ACTB-r | GCCAATCCACACGGAGTACTT | |
| | ACTB-FAM | FAM-TCAAGATCATCGCGCCCCC-NFQ[1] | |
| Mt-RNR 2 (AY526085/ AY126697) | bMT3010-f<br>bMT3096-r<br><br>bMT3030-FAM | GCCCTAGAACAGGGCTTAGT<br>GGAGAGGATTTGAATCTCTGG<br><br>FAM-AAGGTGGCAGAGCCCGGTAATTGC-BHQ1 | 87 |
| *BCL-2* | BCL-2-f | GCACCTGCACACCTGGAT | 72 |
| (XM_586976.4) | BCL-2-r | CGCATGCTAGGGCCATACAG | |
| *BAX* | BAX-f | GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGC | 89 |
| (XM_586976.4) | BAX-r | CAGCCCATGATGGTCCTGATC | |
| *TFAM* | TFAM-f | TTGGAAAAAGAAATCATGCAGAAACGT | 96 |
| (NM_001034016.2) | TFAM-r | TGAGCGAGGTCTTTTCGGTTTT | |

Fonte: Elaboração própria.

## 5.10 ANÁLISE DOS DADOS DE PCR

Para validação dos genes foram considerados os dados da curva padrão com a amostra controle em 5 diluições seriadas 1:1. A partir da inclinação da curva (Slope) e valores de "Ct", pôde-se calcular a eficiência de amplificação ($E=10^{((-1/"SLOPE")-1)}$) individualmente para cada gene estudado. Em seguida estes valores obtidos foram submetidos a um procedimento matemático proposto por Livak e Schmittgen (2001), para que as eficiências fossem validadas frente ao gene endógeno.

## 5.11 VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT

A viabilidade celular foi avaliada usando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 4-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT). Este método é baseado em um ensaio colorimétrico, onde a

redução dos sais amarelos de tetrazolium pela atividade metabólica celular forma cristais insolúveis de formazan, de coloração roxa, que se acumulam em células viáveis (MOSMANN, 1983). De maneira sucinta, ao final dos 13 dias de tratamento com o EtBr, as células foram repicadas e plaqueadas em placas de 96 poços, cada tratamento plaqueado na densidade de $2x10^3$ células, em 6 replicatas, com 100µL de meio de cultivo idêntico ao que foi usado nos demais experimentos. Foram feitas colunas de meio sem células para evitar que a placa secasse. As células dos grupos EtBr-T e EtBr-C foram cultivadas por 60 horas. Para as células do grupo EtBr-R, o meio de cultivo contendo EtBr foi substituído por meio idêntico ao do grupo EtBr-C, 24 horas antes do teste.

O processo que possibilitou a leitura das placas iniciou-se após essas 60 horas, com a adição de 11ul do reagente MTT na concentração de 5mg/ml em cada um dos poços válidos da placa (incluindo a coluna branca) e incubação à estufa por 3 horas para a reação de formação dos cristais de formazan, que ocorreu apenas nas células vivas. Após esse período, todo o líquido contido nas placas foi esgotado com o auxílio de papel absorvente. O álcool isopropílico foi utilizado nos poços válidos no volume de 100ul por poço para dissolver os cristais de formazan formados na reação, possibilitando a leitura espectrofotométrica pelo equipamento Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), com 57nm de comprimento de onda. Os valores de absorbância são expressos como porcentagem em relação ao grupo controle.

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram estatisticamente analisados pelo software Statistical Analysis System (SAS) com 5% de nível de significância. Como teste primário foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e quando necessário o pós-teste “T de student” para quantificação relativa para expressão gênica dos genes alvos e “Tukey” para a quantificação de mtDNA. Todos os experimentos foram repetidos de 3 a 4 vezes.

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

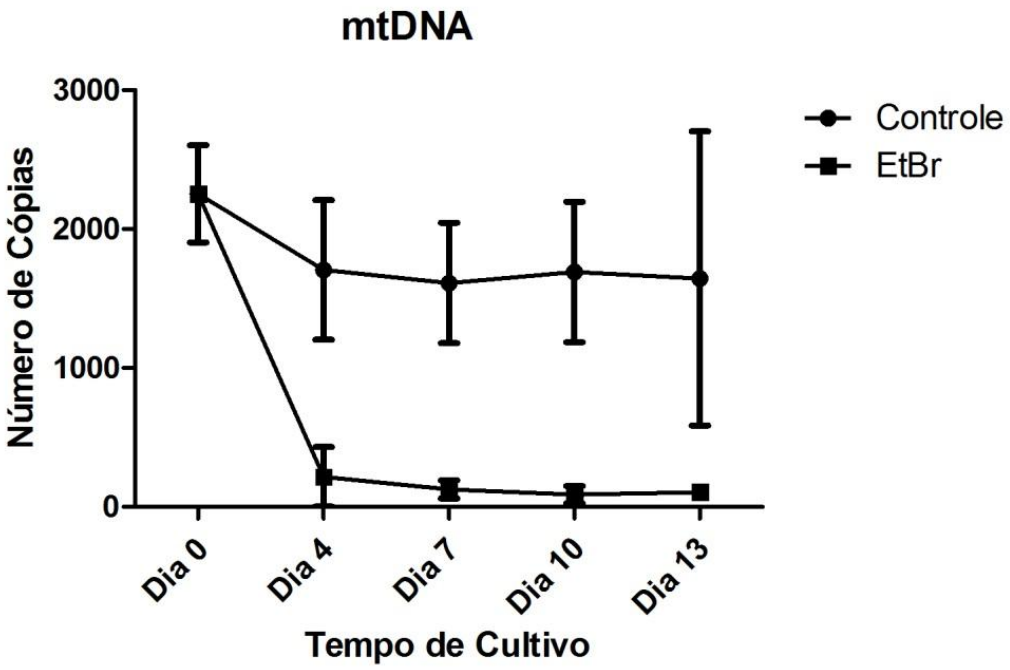
## 6.1 EXPERIMENTO 1

### 6.1.1 Depleção

Apesar de notar-se uma variação na quantidade de cópias de mtDNA no grupo EtBr-C (Figura 4) em relação ao experimento de depleção após 13 dias de tratamento com EtBr, os resultados da quantificação do mtDNA mostram que as células foram depletadas em aproximadamente 90% de seu conteúdo original de mtDNA, quando comparadas ao grupo EtBr-C (P=0,0459). Quando os períodos (D0, D4, D7, D10 e D13) foram analisados separadamente entre os tratamentos, D0 foi o único ponto que não apresentou diferença significativa (P>0,05). Já quando os períodos de um mesmo tratamento foram comparados entre si, não houve diferença para o grupo controle (P=0,51) e houve para o grupo EtBr (P=0,0001). Tal fato pode ser notado na figura 4, onde observamos uma queda acentuada da quantidade de mtDNA entre os períodos D0 e D4.

O resultado encontrado era esperado, uma vez que como o descrito por King e Attardi (1996), usando células 143BTK (linhagem humana de osteosarcoma), como a replicação do mtDNA é inibida, o número inicial de cópias de mtDNA é dividido por dois a cada divisão celular. Nass, (1970), usando fibroblastos de camundongos e Marusich et al. (1997) , fibroblastos humanos (MRC5), Seidel-Rogol e Shadel (2002), células Hela e Armand et al. (2004), usando células linfoblastoides T (MOLT-4), também obtiveram células ρ° através do cultivo com 50ng/µL de EtBr. Por sua vez, Jeng et al. (2008) obteve células ρ° a partir do tratamento de células 143BTK com EtBr, porém utilizou a concentração de 100ng/µL, assim como nós.

Figura 4- Figura comparando o cultivo celular em função do tempo, entre os grupos Controle (EtBt-C) e tratamento com EtBr (EtBr-T)

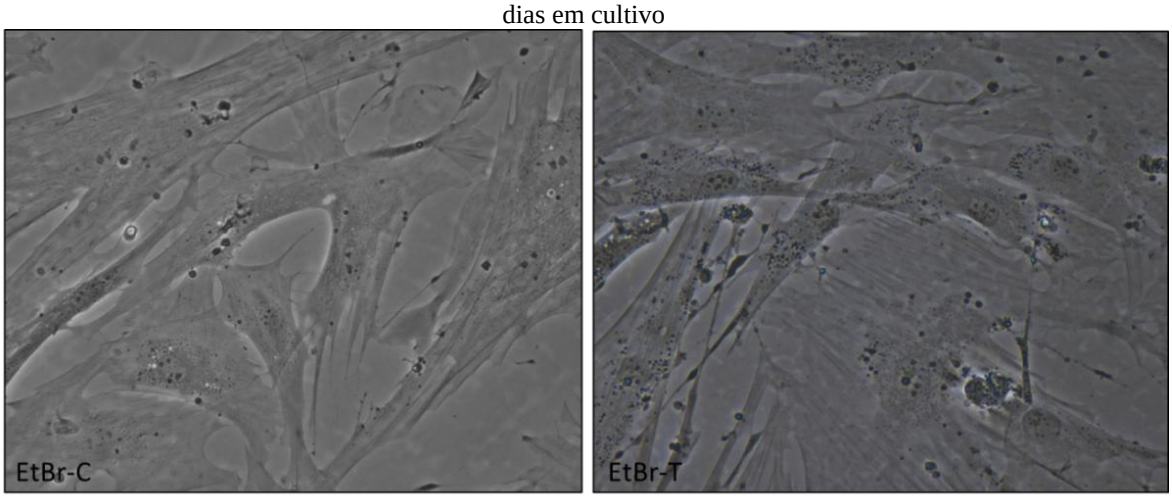



Fonte:Elaboração própria.

### 6.1.2 Morfologia das células Depletadas

Ao contrário do observado por Jeng et al. (2008), não encontramos alterações morfológicas nas células do grupo EtBr-T quando comparadas ao grupo EtBr-C (Figura 5). Jeng et al. (2008) relatou alterações morfológicas em células 143BTK depletadas de mtDNA, independentemente do método de depleção (tratamento com EtBr ou iRNA para nocautear a expressão do TFAM). As células 143BTK$^-$ não depletadas de mtDNA apresentam uma morfologia arredonda e as células depletadas de mtDNA apresentaram-se morfologicamente mais alongadas. Essa diferença provavelmente está relacionada às diferentes linhagens celulares utilizadas nos experimentos.

Figura 5 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 40x dos grupos EtBr-C, EtBr-T após 13 dias em cultivo

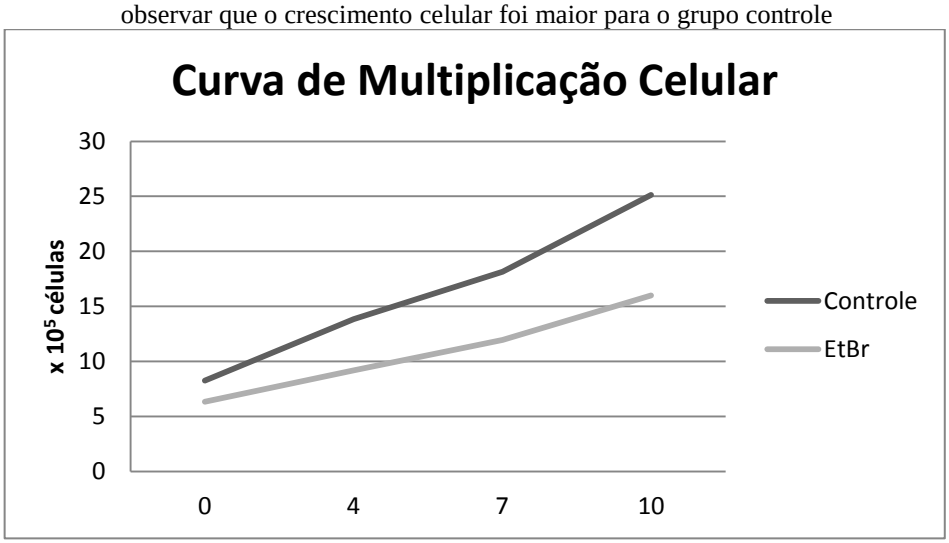



Fonte: Elaboração própria.

### 6.1.3 Multiplicação Celular

Quanto à multiplicação celular (Figura 6), o grupo tratado (EtBr-T) diferiu estatisticamente do grupo controle (EtBr-C), que apresentou um crescimento celular mais elevado, para o mesmo período, o que foi confirmado pelo tempo de duplicação celular mais longo das células tratadas. Armand et al. (2004), observou que as células MOLT-4, apresentaram um crescimento celular mais lento quando cultivadas com EtBr; Magda et al. (2008) com células A549 (células de adenocarcinoma pulmonar) depletadas por exposição ao EtBr e Mineri, et al. (2009), com células 143BTK$^-$ e A549 também tratadas com EtBr encontraram resultados semelhantes.

Figura 6 - Multiplicação celular média dos grupos EtBr-C e EtBr-T em relação aos dias de cultivo. Pode-se observar que o crescimento celular foi maior para o grupo controle




Fonte: Elaboração própria.

### 6.1.4 Expressão Genica

Os genes Bcl-2 e Bax são intimamente associados, uma vez que o primeiro é um anti-apoptótico enquanto o segundo é um pró-apoptótico, e a relação entre os dois é determinante para o destino de uma célula (NAGATA, 1997). Já o Tfam, de acordo com Schauen, (2006), é um gene que representa a quantidade de cópias de mtDNA de uma célula, porém, também existem evidências que atestam que no caso de uma diminuição da quantidade de cópias de mtDNA ocorre aumento da expressão do Tfam (SCRAPULLA, 1997; St. JOHN et al., 2010).

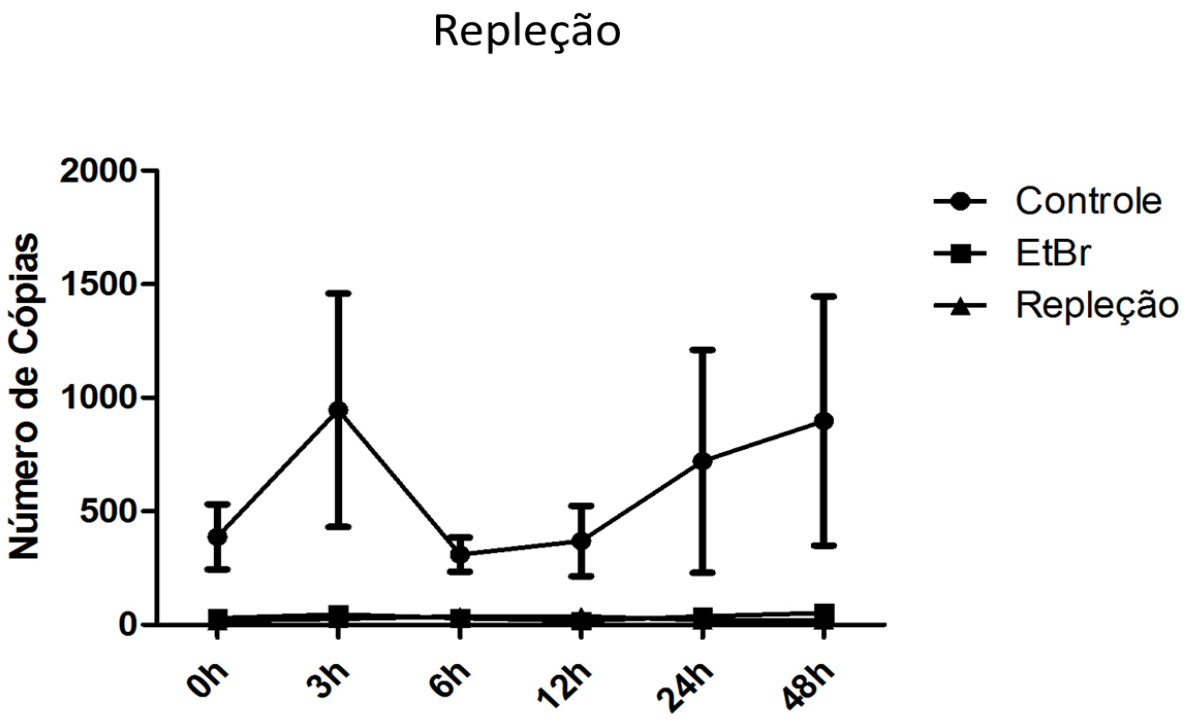
No experimento da depleção, não houve diferença estatística significativa para os três genes-alvo, na comparação entre os grupos EtBr-C e EtBr-T, apesar dos resultados atestando que houve depleção. Já na relação Bcl-2/Bax, houve um aumento da expressão do Bax para o grupo EtBr-T. Este fato talvez esteja associado a influência da ausência de mtDNA no metabolismo celular e pode estar refletido no crescimento celular, mais baixo para as células tratadas.

## 6.2 EXPERIMENTO 2

### 6.2.1 Remoção do EtBr

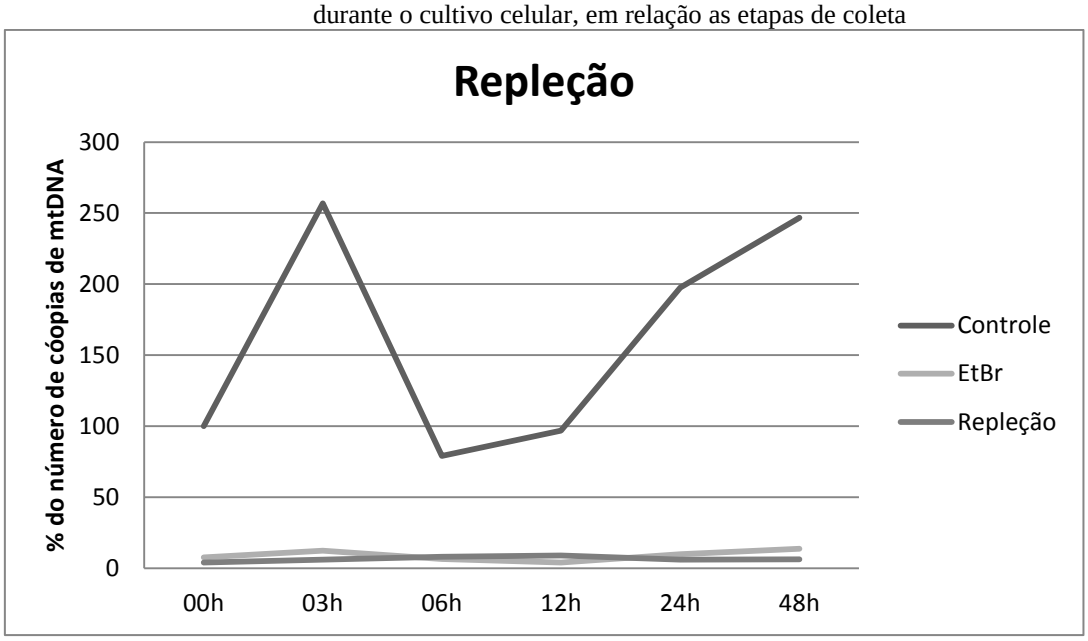
O meio de cultivo contendo EtBr foi removido de parte das células (grupo EtBr-R) após os 14 dias de cultivo. Esperávamos que ocorresse uma repleção do número de cópias do mtDNA, ou seja, uma recuperação das cópias do DNA mitocondrial. Entretanto, os resultados foram contrários aos esperados, e o número de cópias de mtDNA se manteve semelhante ao das células que foram mantidas em cultivo com EtBr, como é possível visualizar na figura 7, onde houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo EtBr-C quando comparado com os demais, porém não houve entre os grupos EtBr-T e EtBr-R. A figura 8 mostra a porcentagem de cópias de mtDNA dos três grupos. Seidel-Rogol e Shadel (2002), que alcançaram aproximadamente 90% de depleção de células Hela em 6 dias de tratamento com EtBr, obtiveram sucesso na repleção do mtDNA de suas células, quando as mesmas ficaram sem exposição a droga por aproximadamente 12 dias, entretanto identificaram uma fase de cerca de 6 dias na qual a replicação manteve-se lenta, antes que houvesse a recuperação total da quantidade de DNA mitocondrial. Para confirmar o efeito permanente da depleção das células tratadas com EtBr deixamos as células do grupo EtBr-R por mais 10 dias em cultivo na ausência de EtBr. Ao final do experimento, como se pode ver na figura 9, as células não apresentaram repleção das cópias de mtDNA.

Figura 7 - Comparação entre os grupos EtBr-T, EtBr-C e EtBr-R considerando o número de cópias de mtDNA durante o experimento de Repleção



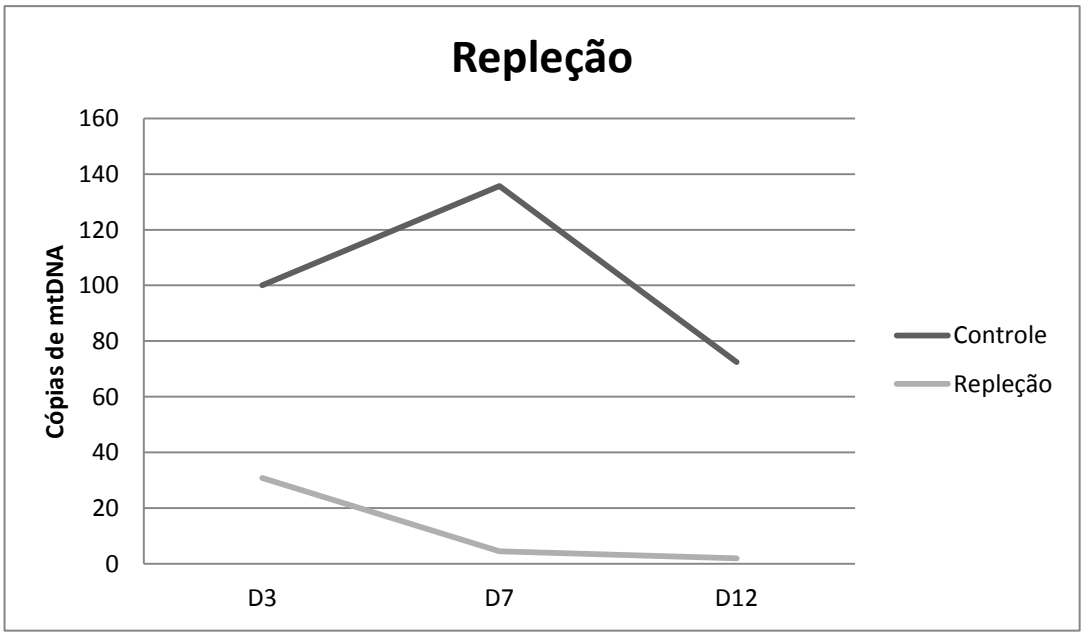

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Gráfico exibindo porcentagem de cópias de mtDNA das células dos grupos EtBr-C, EtBr-T e EtBr-R, durante o cultivo celular, em relação as etapas de coleta




Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Gráfico exibindo número de cópias de mtDNA das células dos grupos EtBr-C e EtBr-R, durante 12 dias de cultivo celular.

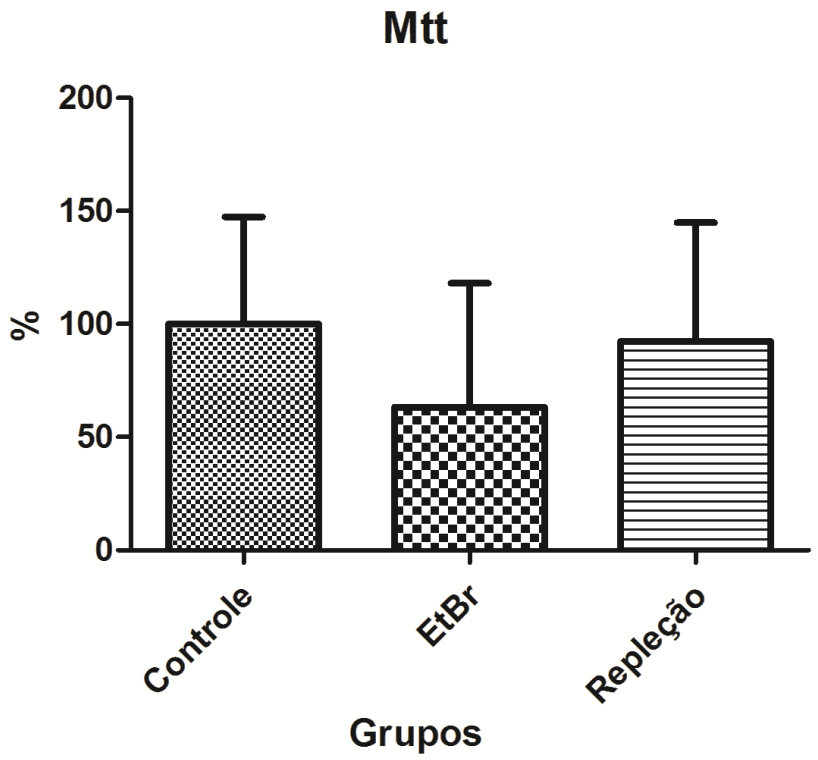



Fonte: Elaboração própria.

### 6.2.2 Ensaio de MTT

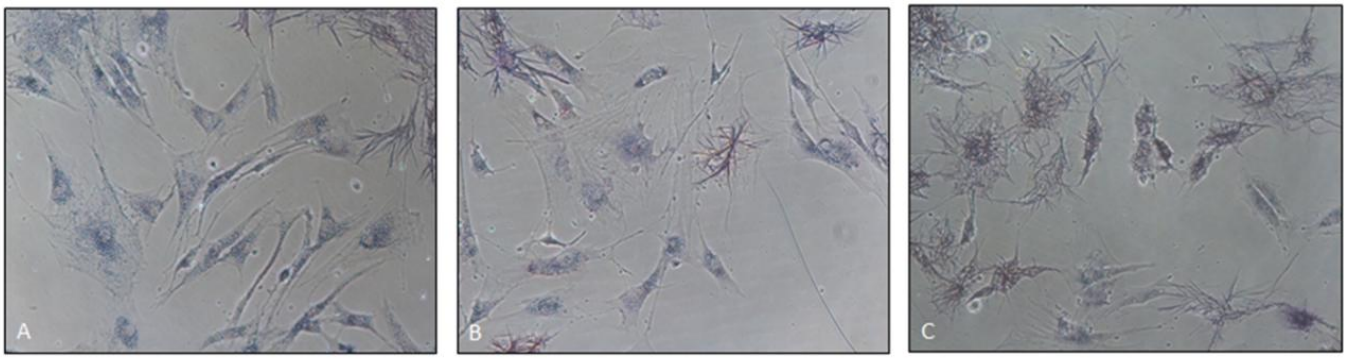
Ao analisar os dados referentes aos ensaios de MTT, como podemos ver na Figura 10, concluímos que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos EtBr-C, EtBr-T e EtBr-R. Como é possível visualizar na figura 11, existem mais células coradas no grupo EtBr-C quando comparado aos outros dois. Uma vez que o tratamento prolongado com EtBr afeta o crescimento celular (vide resultados crescimento celular), é esperado que existam menos células nos grupos tratados, porém, os resultados dos ensaios de Mtt mostram que, uma vez que o meio de cultivo seja suplementado com uridina, o tratamento não afeta a viabilidade celular, como demonstrado por Nass (1970) que observou que o tratamento com EtBr em baixas concentrações, como a utilizada no experimento, afeta apenas o mtDNA e não o nDNA.

Figura 5 - Gráfico exibindo dados referentes aos ensaios de MTT, que mostram a viabilidade celular




Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 20x dos grupos EtBr-C (A), EtBr-T (B) e EtBr-R (C) durante o ensaio de MTT, antes da leitura pelo espectrofotômetro




Fonte: Elaboração própria.

### 6.2.3 Expressão Genica

A análise de expressão genica para o experimento da repleção mostra que houve aumento da relação Bax: Bcl-2 para os grupos EtBr-T e EtBr-R quando comparado ao grupo controle. A associação destes genes controla os mecanismos de apoptose (NAGATA, 1997), no caso, para os grupo EtBr-T e EtBr-R, a relação entre os dois mostra a expressão de Bax aumentada quando comparada ao controle, o que mostra que estas células apresentam um aumento na tendência à morte celular. As semelhanças entre os grupos EtBr-T e EtBr-R mostram que a retirada do EtBr do meio de cultivo não foi suficiente para alterar o comportamento da célula, que se manteve semelhante ao das células em contato com o EtBr, o que pode ser um indício de transformação das mesmas em células $\rho^{o}$. Quando o gene analisado foi o Tfam, apesar de haver uma variação durante o cultivo celular, não houve diferença estatística entre os grupos ao final do experimento. Esses resultados contradizem a literatura consultada, uma vez que de acordo com Scrapulla (1997) e St. John (2010) a diminuição da quantidade de cópias de mtDNA gera aumento da expressão do Tfam enquanto Schauen (2006) atesta que o Tfam é um gene que representa a quantidade de cópias de mtDNA de uma célula, e, portanto, para células com uma baixa quantidade de mtDNA haveria baixa expressão do Tfam.

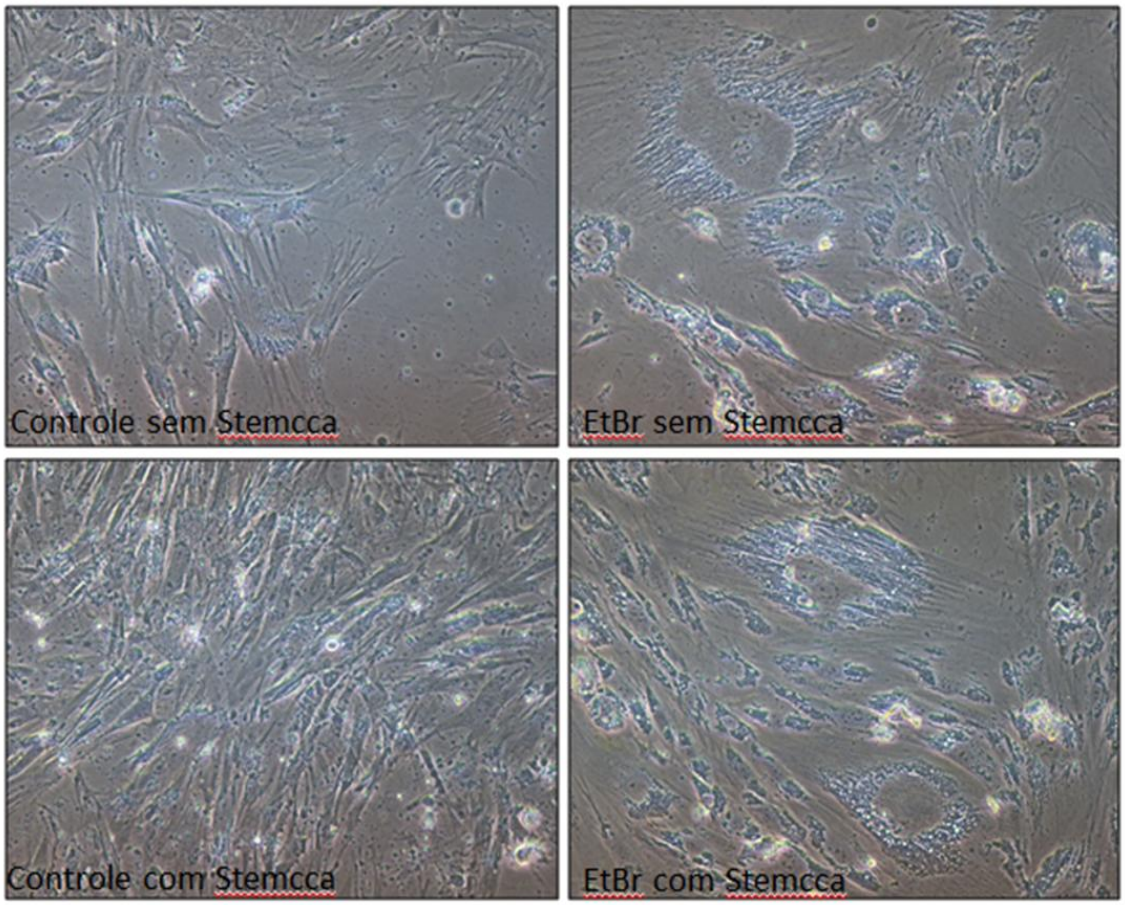
## 6.3 EXPERIMENTO 3

### 6.3.1 Células induzidas a pluripotência

As semelhanças entre as mitocôndrias de células pluripotentes e de células depletadas de mtDNA, como aumento de volume acompanhado da fragmentação mitocondrial e o mal desenvolvimento da crista (NASS, 1970; MARUSICH et al., 1997; ARMAND et al., 2004) nos levaram a acreditar que a utilização das células depletadas para indução à pluripotência facilitaria o processo de reprogramação, uma vez que estas células já apresentariam certos aspectos de células indiferenciadas. Entretanto, não foi possível observar formação de colônias de formato arredondado ou qualquer outra característica de célula iPS nas células dos grupos EtBr-T e EtBr-C transduzidas com vetores lentivirais plasmidiais STEMCCA (Figura 12).

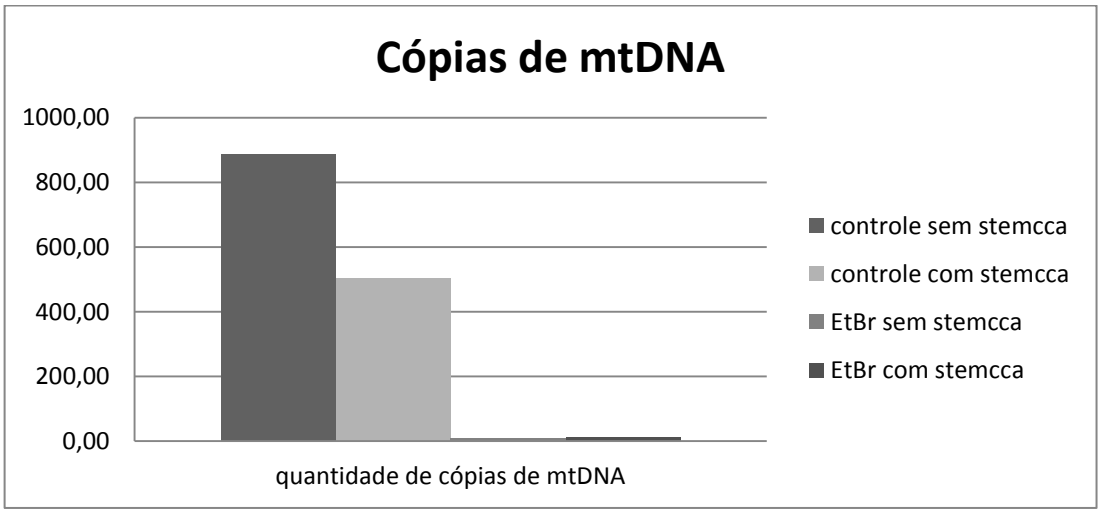
Ainda, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas, ao analisarmos os dados de quantificação de mtDNA, identificamos que, tanto os grupos de células tratadas por EtBr (Grupos 3 e 4) quanto o grupo controle com Stemcca (grupo 1) apresentaram diminuição do número de cópias de mtDNA (Figura 13), o que pode ser um sinal de reprogramação, uma vez que o baixo número de cópias de mtDNA é encontrado em células-tronco embrionárias e em células iPS (KELLY et al., 2011).

Figura 7 - Fotos ao microscópio invertido de fluorescência no aumento 40x dos grupos Controle sem Stemcca; Controle com Stemcca; EtBr sem Stemcca e EtBr com Stemcca mostrando células sem sinais característicos de pluripotência




Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Quantidade de cópias de mtDNA dos grupos Controle sem Stemcca, Controle com Stemcca, EtBr sem Stemcca e EtBr com Stemcca




Fonte: Elaboração própria.

### 6.3.2 Expressão Genica

Para a analise de expressão gênica das células depletadas de mtDNA que passaram por transdução de fatores de indução a pluripotência, não houve diferenças entre os grupos em relação ao Tfam, o que não era aguardado, uma vez que altos níveis de expressão de genes associados à pluripotência, esperado para o caso, considerando a transdução com Stemcca, estão associados a baixos níveis de expressão de fatores de replicação de mtDNA, como o Tfam (FACUCHO-OLIVEIRA; ST. JOHN, 2009).

A relação Bcl-2/Bax também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Este pode ser um sinal de que tanto a transdução quanto o tratamento com EtBr levam a diminuição do número de cópias de mtDNA, mas não são suficientes para gerar uma reprogramação total, nem isoladamente, nem em conjunto.

# 7 CONCLUSÃO

Foi possível obter células depletadas em mais de 90% do seu conteúdo original de mtDNA, capazes de se manter vivas *in vitro*, por tratamento com EtBr mas não houve, nas células depletadas de mtDNA (grupo EtBr-T), a aumento da expressão do Tfam. Conforme hipótese proposta, observa-se a diminuição do crescimento celular das células tratadas com EtBr, sem diferenças quanto a viabilidade celular nas células do grupo EtBr-T em relação ao grupo EtBr-C. O experimento da repleção mostrou que, em 48 horas sem a exposição ao EtBr não há recuperação do número de cópias de mtDNA das células depletadas de mtDNA. Quanto ao experimento 3, a transdução de fatores de reprogramação em células bovinas tratadas com EtBr levou a Diminuição do número de cópias de mtDNA, assim como a transdução dos vetor de pluripotencia porém em níveis muito maiores, todavia nenhum tratamento resultou em reprogramação completa.

Concluindo, este trabalho no nosso conhecimento, descreve pela primeira vez a produção de células bovinas Rho 0 e discute sobre a relação da função mitocondrial e o processo de reprogramação celular entretanto, maiores estudos são necessários para esses mecanismos sejam totalmente esclarecidos.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell.** 5, ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. Cap. 14.

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN, M. H.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.

ARMAND, R.; CHANNON, J. Y.; KINTNER, J.; WHITE, K. A.; MISELIS, K. A.; PEREZ, R. P.; LEWIS, L. D. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 196, n. 1, p. 68-79, 2004.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 313–319, 2008.

BONAWITZ, N. D.; CLAYTON, D. A.; SHADEL, G. S. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. **Molecular Cell,** v. 24, p. 813-25, 2006.

BRENNER, C.A.; WONLY, Y.M.; BARRITT, J.A.; MATT, D.W.; MUNNÉ, S.; COHEN, J. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 887-892, 1998.

BROWN, T.A.; CLAYTON, D.A. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 2004-2010, 2002.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 278-94, 1997.

CHIARATTI, M. R.; BRESSAN, F. F.; FERREIRA, C. R.; CAETANO, A. R.; SMITH, L. C.; VERCESI, A. E.; MEIRELLES, F. V. Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of Reproduction,** v. 82, p. 76–85, 2010.

D'ERRICO, I.; REYES, A.; DINARDO, M. M.; GADALETA, G. Study of the mitochondrial transcription factor A (Tfam) gene in the primate *presbytis cristata*. **Gene**, v. 18, p. 117-124, 2005.

DÍEZ-SÁNCHEZ, C.; RUIZ-PESINI, E.; LAPEÑA, A.C.; MONTOYA, J.; PEREZ-MARTOS, A.; ENRIQUEZ, J.A.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. **Biology of Reproduction,** v. 68, p. 180-185, 2003.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315– 317, 2006.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.

FACUCHO-OLIVEIRA, J. M.; ST JOHN, J. C. The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, p. 140–158, 2009.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-47, 1968.

GARESSE, R.; VALLEJO, C. G. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. **Gene,** v. 263, p. 1-16, 2001.

GARSTKA, H. L.; FÄCKE, M.; ESCRIBANO, J. R.; WIESNER, R. J. Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 200, p. 619-626, 1994.

GENSLER S.; WEBER, K. M.; SCHMITT, W. E.; MARTOS, A. P.; ENRIQUEZ, J. A.; MONTOYA, J.; WIESNER, R. J. Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7s DNA synthesis. **Nucleic Acids Research,** v. 29, p. 3657-63, 2001.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUEE, K.; OGURA, A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 285, n. 41, p. 31362-31369, 2010.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v. 132, p. 567-582, 2008.

JENG, J. Y.; YEH, T. S.; LEE, J. W.; LIN, S. H.; FONG, T. H.; HSIEH, R. H. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 1, p. 347-357, 2008.

KANKI, T.; NAKAYAMA, H.; SASAKI, N.; TAKIO, K.; ALAM, T. I.; HAMASAKI, N.; KANG, D. Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. **Annals of the New York Academy of Science,** v. 1011, p. 61–68, 2004.

KELLY, R. D.; SUMER, H.; MCKENZIE, M.; FACUCHO-OLIVEIRA, J.; TROUNCE, I.A.; VERMA, P. J.; ST. JOHN, J. C. The effects of nuclear reprogramming on mitochondrial DNA replication. **Stem Cell Reviews,** Oct 13. [Epub ahead of print], 2011.

KHAN, S. M.; SMIGRODZKI, R. M.; SWERDLOW, R. H. Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects. **American Journal of Physiology**, v. 292, n. 2, p. 658-669, 2007.

KING, M. P.*;* ATTARDI, G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. **Method in Enzymology**, v. 264, p. 304-313, 1996.

LEE, D. Y.; CLAYTON, D. A. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 46, p. 30614-30621, 1998.

LEE, H. C.; CHANG, C. M.; CHI, C. W. Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 47-58, 2010. Supplement. 1.

LI, Y.; CANG, M.; LEE, A. S.; K. ZHANGE, K.; LIU, D. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. 15947, 2011.

LI, W.; WEI, W.; ZHU, S.; ZHU, J.; SHI, Y.; LIN, T.; HAO, E.; HAYEK, A.; DENG, H.; DING, S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 16-19, 2009.

LIU, H.; ZHU, F.; YOUNG, J.; ZHANG, P.; HOU, P.; LI, H.; JIANG, W.; CAI, J.; LIU, M.; CUI, K.; QU, X.; XIANG, T.; LU, D.; CHI, X.; GAO, G.; JI, W.; DINGE, M.; DENG, H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 587-590, 2008.

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. 402-408, 2001.

LLOYD, R.E.; LEE, J.H.; ALBIERO, R.; BOWLES, E.J.; SANTOS, J.R.; CAMPBELL, K.H.S.; ST. JOHN, J.C. Aberrant nucleo-cytoplasmic cross-talk results in donor cell mtDNA. **Genetics Society of America**, v. 172, n. 4, p.2515-2527, 2006.

MAGDA, D.; LECANE, P.; PRESCOTT, J.; THIEMANN, P.; MA, X.; DRANCHAK, P. K.; TOLENO, D. M.; RAMASWAMY, K.; SIEGMUND, K. D.; HACIA, J.G. MtDNA depletion confers specific gene expression profiles in human cells grown in culture and in xenograft. **BioMed Central Genomics**, v. 3, n. 9, p. 521, 2008.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, p. 7634-7638, 1981.

MARUSICH, M. F.; ROBINSON, B. H.; TAANMAN, J. W.; KIM, S. J.; SCHILLACE, R.; SMITH, J. L.; CAPALDI, R. A. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived ρ° human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 31, n. 1362, p. 145-159, 1997.

MIRANDA, M. S.; BRESSAN, F. F.; ZECCHIN, K. G.; VERCESI, A. E.; MESQUITA, L. G.; MERIGHE, G. K.; KING, W. A.; OHASHI, O. M.; PIMENTEL, J. R.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2009.

MINERI, R.; PAVELKA, N.; FERNANDEZ-VIZARRA, E.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ZEVIANI, M.; TIRANTI, V. How do human cells react to the absence of mitochondrial DNA? **PLoS One**, v. 28, n. 5, p. 5713, 2009.

MONTOYA, J.; MARTOS, A. P.; HEIKE L. GARSTKA, H. L.; WIESNER, R. J. Regulation of mitochondrial transcription by mitochondrial transcription factor A. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 174, p. 227–230, 1997.

MOSNA, F.; SENSEBE, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells; Development**, v. 19, p. 1449–1470, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 115, n. 2, p. 158-168, 2008.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 355-365, 1997.

NAGY, K.; SUNG, H. K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHA-MOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. **Stem Cell Reviews**, v. 7, n. 3, p. 693-702, 2011. Erratum in: **Stem Cell Reviews**, v. 8, n. 2, p. 546, 2012.

NASS, M. M. Abnormal DNA patterns in animal mitochondria: ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 67, n. 4, p. 1926-1933, 1970.

NICKLAS, J. A.; BROOKS, E. M.; HUNTER, T. C.; SINGLE, R.; BRANDA, R. F.; Development of a quantitative PCR (Taqman) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 4, p. 313-320, 2004.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, v. 29, p. 29-35, 2008, Supplement. A.

OHTA, S. Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4768-4776, 2006.

POULTON, J.; CHIARATTI, M.R.; MEIRELLES, F.V.; WELLS D. Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 820-828, 2010.

RAMALHO-SANTOS, J.; VARUM, S.; AMARAL, S.; MOTA, P.C.; SOUSA, A.P.; AMARAL, A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 5, p. 553-572, 2009.

REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M-F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 425-429, 2001.

SAMPAIO, R.V.; CHIARATTI, M.R.; BRESSAN, F.F.; SANGALLI, J.R.; MIRANDA, M.S.; BEM, T.H.C.; SANTOS, S. S. V.; AMBRÓSIO, C. E.; OHASHI, O. M. Isolation and characterization of bovine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. R**eproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 356-356, 2010.

SATHANANTHAN, H.; PERA, M.; TROUNSON, A. The fine structure of human embryonic stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, n. 1, p. 56-61, 2002.

SCARPULLA, R.C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. **Journal of Bioenergetics; Biomembranes**, v. 29, n. 2, p. 109-119, 1997.

SCARPULLA, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 611-638, 2008.

SCHAUEN, M.; SPITKOVSKY, D.; SCHUBERT, J.; FISCHER, J.H.; HAYASHI, J.; WIESNER, R.J. Respiratory chain deficiency slows down cell-cycle progression via reduced ROS generation and is associated with a reduction of p21CIP1/WAF1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, n. 1, p. 103-112, 2006.

SCHROEDER, P.; GREMMEL, T.; BERNEBURG, M.; KRUTMANN, J. Partial depletion of mitochndrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 9, p. 2297-2303, 2008.

SCHWARK, N.W.; CAVELIER, L.; CORTOPASSI, G.A. A low dose of ethidium bromide leads to an increase of total mitochondrial DNA while higher concentrations induce the mtDNA4997 deletion in a human neuronal cell line. **Mutation Research**, v. 596, p. 57-63, 2006.

SEIDEL-ROGOL, B.L.; SHADEL, G.S. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 1929-1934, 2002.

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

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. **Molecular Reproduction; Development**, v. 77, n. 1, p. 2, 2010.

ST. JOHN, J.C.; FACUCHO-OLIVEIRA, J.; JIANG, Y.; KELLY, R.; SALAH, R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 5, p. 488-509, 2010.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells Development**, v. 20, n. 14, p. 2724-2752, 2012.

TAANMAN, J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 9, n. 2, p. 103-123, 1999.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

VILLA, A.M.; FUSI, P.; PASTORI, V.; AMICARELLI, G.; POZZI, C.; ADLERSTEIN, D.; DOGLIA, S.M. Ethidium bromide as a marker of mtDNA replication in living cells. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 4, p. 46001, 2012.

WEBER, K.M.; GOFFART, S.; GARSTKA, H.L.; MONTOYA, J.; WIESNER, R.J. Transient overexpression of mitochondrial transcription factor a (Tfam) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 6015-6027, 2004.

WU, Z.; CHEN, J.; REN, J.; BAO, L.; LIAO, J.; CUI, C.; RAO, L.; LI, H.; GU, Y.; DAI, H.; ZHU, H.; TENG, X.; CHENGE, L.; XIAO, L. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. **Journal of Mollecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 46-54, 2009.

# APÊNDICE

## APÊNDICE A - MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

1- Para cada microtubo (amostra), preparar a solução:
80 μL da solução de tampão de proteinase K → dar suporte para poder agir
280 μL de água ultrapura
10 μL de SDS 20% → detergente que extrai lipídeos
8,0 μL de proteinase K (25 mg/mL) → atuante sobre as proteínas
Volume total de 378 μL.
2- Distribuir o conteúdo nos microtubos que já estão com os núcleos que contém DNA.
3- Aquecer a 55ºC, agitando periodicamente, durante 3 horas ou até que a solução fique completamente transparente [Shaker (210 rpm), Banho-Maria ou Banho Seco]. Procurar manter os núcleos em suspensão agitando devagar (com os dedos). Opcional: 37ºC overnight.
4- Manter a 4ºC durante aproximadamente 15 minutos, para evitar choque térmico com a solução de NaCl gelada.
5- Adicionar nos microtubos 120 μL de solução de NaCl a 5 M.
6- Passar cada amostra no agitador, em velocidade máxima, por 08 segundos.
7- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente, para peletização da proteína desnaturada.
8- Preparar e identificar novos microtubos de acordo com o número de amostras que se está analisando.
9- Transferir 400 μL do sobrenadante, usando ponteira de 1000 μL, para seu respectivo tubo pré-preparado. Cuidado para não pipetar a proteína (fio branco).
10- Adicionar 1,0 mL de etanol 95% ou absoluto.
11- Homogeneizar por inversão 2 ou 3 vezes.
12- Manter no *freezer* a –80ºC durante 15 minutos.
13- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC (centrífuga refrigerada).
14- Manter no *freezer* a –20ºC durante, no mínimo, 30 minutos ou **a –80ºC durante 20 minutos**. Cuidado para não mover bruscamente.
15- Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC (centrífuga refrigerada).
16- Descartar o sobrenadante tomando cuidado para não descartar o pellet.
17- Opcional: adicionar 1,0 mL de etanol 70% gelado e centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.
18- Descartar o sobrenadante tomando cuidado para não descartar o pellet. Deixar invertido sobre papel absorvente para retirar o excesso de álcool.
19- Secar a vácuo por 30 minutos:
→ Colocar as amostras no dessecador;
→ Tampar e abrir a válvula de escape de ar;
→ Ligar a bomba para retirada do ar até que a tampa do dessecador fique com dificuldade de ser removida (± 60 na bomba);
→ Desligar a bomba e fechar a válvula de escape;
→ Aguardar 30 minutos.
20- Adicionar 50 μL de água ultrapura e homogeneizar com a ponteira ou com os dedos.
21- Aquecer a 37ºC durante 1 hora para fazer a diluição do DNA [shaker (100 rpm), banho-Maria ou banho seco].

SOLUÇÕES

Solução para lise de hemácias

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 1,0 L |
|---|---|---|---|
| Sacarose (PM = 342,30) | Synth/S1002.01.AH | 0,32 M | 109,6 g |
| Tris-HCl 1 M - pH 7,5 | Solução 2 | 12 mM | 12,0 mL |
| $MgCl_2$ 1 M | Solução 3 | 5,0 mM | 5,0 mL |
| Triton x-100 | Amersham/22686 | 1% | 10,0 mL |
| Água ultrapura | | ------- | completar 1L |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 600 mL de água ultrapura autoclavada;
Pesar a sacarose e dissolver na água sob agitação;
Adicionar a solução de tris-HCl, $MgCl_2$ e triton e aguardar completa homogeneização;
Completar o volume para 1,0 L em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Solução de Tris-HCl 1 M (PM = 121,14)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 500 mL |
|---|---|---|---|
| Tris | Amersham/US75825 | 1,0 M | 60,57 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 500 mL |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 300 mL de água ultrapura autoclavada;
Pesar os componentes e dissolver na água sob agitação;
Na capela: corrigir o pH para 7,5 adicionando aproximadamente 30 mL de HCl PA (pH inicial ≅ 10,35) e aguardar completa homogeneização;
Completar o volume para 500 mL em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Solução de $MgCl_2.6H_2O$ 1 M (PM = 203,30)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 50 mL |
|---|---|---|---|
| $MgCl_2.6H_2O$ | Reagen | 1,0 M | 10,16 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 50 mL |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 30 mL de água ultrapura autoclavada;
Pesar os componentes e dissolver na água sob agitação;
Completar o volume para 50 mL em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Solução de NaCl 5 M (PM = 58,44)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 50 mL |
|---|---|---|---|
| NaCl | Amersham/21618 | 5,0 M | 14,61 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 50 mL |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 30 mL de água ultrapura autoclavada;
Pesar os componentes e dissolver na água sob agitação;
Completar o volume para 50 mL em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Tampão para proteinase k

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 50 mL |
|---|---|---|---|
| NaCl 5 M | Solução 4 | 0,375 M | 3,75 g |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | Solução 6 | 0,12 M | 12,0 mL |
| Água ultrapura | | ------- | completar 50 mL |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 30 mL de água ultrapura autoclavada;
Adicionar os demais componentes e homogeneizar sob agitação;
Completar o volume para 50 mL em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Solução de EDTA 0,5 M, pH = 8,0
EDTA.$Na_2$.$2H_2O$ = $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$.$2H_2O$ (PM = 372,24)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 1,0 L |
|---|---|---|---|
| $Na_2$EDTA | Amersham/US75825 | 0,5 M | 186,12 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 1L |

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 500 mL de água ultrapura autoclavada;
µL Pesar o EDTA e dissolver na água sob agitação;
Corrigir o pH para 8,0 com solução de NaOH 10 N (aproximadamente 10 mL – solução 8);
Apenas alterando o pH, é que haverá dissolução do EDTA. Conforme o EDTA vai dissolvendo, o pH tende a cair novamente, portanto deve-se controlar o pH até a completa dissolução do EDTA.
Completar o volume para 1,0 L em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar a 4ºC.

Solução de NaOH 10 N (corrigir pH)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 50 mL |
|---|---|---|---|
| NaOH PA | Nuclear/311913 | 10 N | 20,0 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 50 mL |

Homogeneizar e estocar a 4ºC.

Solução de SDS 20% (PM = 288,38)

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Para 10 mL |
|---|---|---|---|
| SDS | Amersham/US75819 | 20% | 2,0 g |
| Água ultrapura | | ------- | completar 10 mL |

Homogeneizar e estocar a 4ºC.

Procedimento

Preparar a solução em vidraria limpa e estéril;
Num copo de Becker, acrescentar aproximadamente 7 mL de água ultrapura autoclavada;
Pesar o SDS e dissolver na água sob aquecimento a 68ºC, agitando com a espátula;
Corrigir o pH para 7,2 com solução de HCl;
Completar o volume para 10 mL em balão volumétrico;
Identificar o frasco de armazenagem e estocar em temperatura ambiente.

Solução de proteinase k 25 mg/mL

| Componente | Laboratório/Código | Concentração | Frasco de 100 mg |
|---|---|---|---|
| Proteinase k | | 25 mg/mL | 100 mg |
| Água ultrapura | | ------- | 4,0 mL |

Homogeneizar e estocar a -20ºC em alíquotas de 500 μL.