

THIAGO SIMÕES MACHADO

**Mitofusinas em oócitos murinos: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial**

São Paulo

2018

THIAGO SIMÕES MACHADO

**Mitofusinas em oócitos murinos:** seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial

Tese 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 Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de concentração:**

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Paulo  
2018

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3735  
FMVZ

Machado, Thiago Simões  
Mitofusinas em oócitos murinos: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial/  
Thiago Simões Machado. – 2018.  
125 p. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

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. DNA mitocondrial. 2. Mitocôndria. 3. Fusão mitocondrial. I. Título.

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Mitofusinas em oócitos murinos: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial", protocolada sob o CEUA nº 6975300115 (ID 002506), sob a responsabilidade de **Marcos Roberto Chiaratti e equipe; Thiago Simões Machado; Nadja Cristhina de Souza Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 29/06/2016.

We certify that the proposal "Mitofusins in murine oocytes: their roles in fertility and mitochondrial inheritance", utilizing 40 Heterogenics mice (40 females), protocol number CEUA 6975300115 (ID 002506), under the responsibility of **Marcos Roberto Chiaratti and team; Thiago Simões Machado; Nadja Cristhina de Souza Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/29/2016.

São Paulo, 13 de dezembro de 2018

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



São Paulo, 12 de dezembro de 2018  
CEUA N 6975300115

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcos Roberto Chiaratti  
Área: 0

Título da proposta: "Mitofusinas em oócitos murinos: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004124)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 07/outubro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim, todos os objetivos foram cumpridos ao longo do projeto de doutorado do aluno. Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim, a partir o projeto de pesquisa referido, já surgiram dois outros projetos de mestrado e dois projetos de iniciação científica. 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Resp: O N amostral foi adequado e suficiente para a realização do projeto. Foram utilizados os 140 animais do formulário aprovado. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não houve perdas. 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não houve evento adverso durante a condução do estudo. A metodologia empregada já era e domínio da equipe de trabalho e somente alguns ajustes foram feitos de forma a viabilizar todos os experimentos necessários. 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Resultados parciais já foram apresentados em pelo menos três congressos importantes na área, nacional e internacionalmente. 6. Resultados já publicados? Resp: O aluno e a equipe de trabalho pretendem finalizar e submeter o primeiro (de três) artigo do projeto ainda neste semestre."

Comentário da CEUA: ""

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACHADO, Thiago Simões

Título: **Mitofusinas em oócitos murinos**: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a).  
Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a).  
Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a).  
Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a).  
Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

# DEDICATÓRIA

---

*Para aqueles que me ergueram  
nos tropeços  
Para os que ofereceram sorriso em  
meio das lágrimas  
Para os que me fizeram ver além  
do horizonte  
Para os que me fizeram alcançar  
novas alturas  
Para os que veem desenhos nas  
nuvens  
Para os que amam e perdoam  
Para os que vivem o hoje  
intensamente  
Para os que perseveram  
Para os que sonham  
Para os que creem*

**(MACHADO, 2018)**

# **AGRADECIMIENTOS**

---



*Aos meus pais por me estimularem a aprender e explorar o mundo de forma criativa, como um cientista faz em sua essência!*

*Aos colegas dos laboratórios que tive a oportunidade de conhecer e aprender, alunos, estagiários, técnicos, seguranças e equipe de limpeza. A Bruna Martins Garcia, Karen Freire Carvalho e Fernanda Karina Ribeiro da Silva, por me acolherem numa nova cidade e cuidarem de mim como irmãs, aprendendo e crescendo juntos.*

*Ao meu professor Marcos Roberto Chiaratti, que por oito anos me inspirou e mostrou como trilhar uma direção profissional com excelência e disciplina.*

*À Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo; como também a Universidade Federal de São Carlos que proporcionaram os recursos e infraestrutura para a realização desta pesquisa.*

*Para você que sempre lê os agradecimentos e nunca acha seu nome; dessa vez é diferente! Talvez eu não o conheça ou não terei tal oportunidade, talvez não o veja ou esteja distante, mas agradeço o interesse de ler este trabalho e espero que possa lhe trazer algo positivo! Obrigado a você!*

*Há muitos mais a quem gostaria de agradecer, mas o espaço e seu tempo de leitura me compelem a encerrar por aqui.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Também agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo pelo apoio deste projeto.*

*“Um investimento em conhecimento paga o melhor  
interesse.”*

*Benjamin Franklin*

## RESUMO

MACHADO, T. S. **Mitofusinas em oócitos murinos**: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial. [Mitofusins in murine oocytes: their roles in fertility and mitochondrial inheritance]. 2018. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Durante a oogênese o oócito sofre intensas mudanças quanto a morfologia mitocondrial e número de organelas. Uma vez que a fusão e fissão mitocondrial atuam diretamente na dinâmica mitocondrial, tais processos devem ser determinantes para o desenvolvimento oocitário. O formato arredondado e pequeno das mitocôndrias oocitárias sugere que essas organelas sejam incompetentes para a fusão. É possível que tal realidade favoreça a segregação de moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) mutantes. Assim, este projeto teve como objetivo investigar o papel da fusão mitocondrial no oócito e suas consequências tanto para fertilidade quanto para a herança mitocondrial. Para tal, genes-chave para a fusão mitocondrial (*Mfn1* e *Mfn2*) foram nocauteados exclusivamente nos oócitos de camundongos portadores de dois haplótipos mitocondriais, mtDNA C57BL/6 (B6) e NZB/BINJ (NZB). Oócitos selvagens (WT) ou nocautes para *Mfn1* (*Mfn1* cKO), *Mfn2* (*Mfn2* cKO) ou ambos (*Mfn1&2* cKO) foram comparados quanto a competência de desenvolvimento, função mitocondrial e herança do mtDNA NZB. O acasalamento de fêmeas contendo oócitos *Mfn1* cKO com machos WT não resultou em nascimento. Tal infertilidade associou-se à falha na ovulação, acúmulo de folículos e bloqueio da progressão meiótica quando do cultivo *in vitro*. Oócitos *Mfn1* cKO também apresentaram menor diâmetro e menor nível de mtDNA e agregação mitocondrial. Já os oócitos *Mfn2* cKO, não foram afetados quanto ao nível de mtDNA. Como resultado, o número de nascimentos não diferiu entre fêmeas *Mfn2* cKO e WT. Surpreendentemente, o duplo nocaute resultou em efeito menos severo que o nocaute do *Mfn1*, sendo que o desenvolvimento folicular não foi comprometido e oócitos *Mfn1&2* cKO apresentaram nível intermediário de mtDNA (comparado com oócitos WT e *Mfn1* cKO), agregação mitocondrial e do retículo endoplasmático. Apesar de ovulados, os oócitos *Mfn1&2* cKO apresentaram bloqueio da maturação meiótica. Como resultado, esses oócitos se mostraram incompetentes em suportarem o desenvolvimento a termo. No que se refere a herança mitocondrial, primeiramente observamos que quanto maior o nível de mtDNA NZB da fêmea doadora, maior a eliminação de mtDNA NZB nos oócitos, pois fêmeas com 60-80%

de mtDNA NZB apresentaram oócitos com redução de  $13,1\% \pm 1,99$  do mtDNA NZB ( $\Delta$ NZB). Assim, utilizamos fêmeas de maior quantidade de mtDNA NZB para melhor observar o comportamento de herança. O nível de mtDNA NZB diminuiu em oócitos WT e *Mfn1* cKO em comparação com as fêmeas doadoras, sugerindo uma seleção contra o mtDNA mutante. Contudo, tal seleção foi ao menos 50% menos eficaz em oócitos maduros *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO, evidenciando um possível papel desempenhado pelo *Mfn2* na eliminação do mtDNA NZB. A mesma análise, quando feita em oócitos imaturos, cauda, fígado e baço, apresentou os mesmos comportamentos reportados em cada grupo. Não foi observada diferença entre as gerações de uma mesma fêmea. Em suma, este trabalho indica que o *Mfn1* é essencial para promover oócitos com competência de desenvolvimento, enquanto que o *Mfn2* participa da eliminação de mtDNA mutante no oócito. Esses achados dão suporte ao papel-chave das mitofusinas na modulação da dinâmica mitocondrial visando o atendimento às exigências dos oócitos e prevenção da herança de mutações no mtDNA.

**Palavras-chave:** DNA mitocondrial. Mitocôndria. Fusão mitocondrial.

## ABSTRACT

MACHADO, T. S. **Mitofusins in murine oocytes**: their roles in fertility and mitochondrial inheritance. [ Mitofusinas em oócitos murinos: seus papéis na fertilidade e na herança mitocondrial]. 2018. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

During oogenesis the oocyte undergoes intense changes in mitochondrial morphology and number of organelles. Since mitochondrial fusion and fission act directly on mitochondrial dynamics, such processes must be determinant for oocyte development. The small and rounded shape of the oocyte mitochondria suggests that these organelles are incompetent for fusion. This could favor the segregation of mitochondrial DNA molecules (mtDNA) mutants. Thus, this project aimed to investigate the role of mitochondrial fusion in the oocyte and its consequences both for fertility and for mitochondrial inheritance. To that end, key genes for mitochondrial fusion (*Mfn1* and *Mfn2*) were knocked out exclusively in the oocytes of mice bearing two mitochondrial haplotypes, mtDNA C57BL / 6 (B6) and NZB / BINJ (NZB). Wild oocytes (WT) or knockouts for *Mfn1* (*Mfn1* cKO), *Mfn2* (*Mfn2* cKO) or both (*Mfn1&2* cKO) were compared for developmental competence, mitochondrial function and NZB mtDNA inheritance. The mating of females containing *Mfn1* cKO oocytes with WT males did not result in birth. Such infertility was associated with ovulation failure, follicle accumulation, and blockage of meiotic progression during *in vitro* culture. *Mfn1* cKO oocytes also showed smaller diameter and lower level of mtDNA and mitochondrial aggregation. However, the *Mfn2* cKO oocytes were not affected in the mtDNA levels. As a result, the number of births did not differ between *Mfn2* cKO and WT females. Surprisingly, the double knockout resulted in a less severe effect than the *Mfn1* cKO, with follicular development not compromised and *Mfn1&2* cKO oocytes had intermediate mtDNA levels (compared to WT and *Mfn1* cKO oocytes), mitochondrial and reticulum aggregation endoplasmic. Despite ovulation, the *Mfn1&2* cKO oocytes showed blockage of meiotic maturation. As a result, these oocytes proved to be incompetent in supporting full-term development. Regarding mitochondrial inheritance, we first observed that the higher the level of NZB mtDNA of the female donor, the greater is the elimination of NZB mtDNA in the oocytes, since females with 60-80% of mtDNA NZB presented oocytes with a reduction of  $13.1\% \pm 1.99$  of NZB mtDNA ( $\Delta$ NZB). Thus, we used females with higher amounts of NZB mtDNA to better observe the inheritance behavior. The NZB mtDNA level decreased in WT and in *Mfn1* cKO

oocytes compared to donor females, suggesting a selection against mutant mtDNA. However, this selection was at least 50% less effective in mature oocytes *Mfn2* cKO and *Mfn1&2* cKO, evidencing a possible role played by *Mfn2* in the elimination of mtDNA NZB. The same analysis, when performed on immature oocytes, tail, liver and spleen, presented the same behaviors reported in each group. No difference was observed between the generations of the same female. In summary, this work indicates that *Mfn1* is essential for promoting oocytes with developmental competence, whereas *Mfn2* participates in the elimination of mutant mtDNA in the oocyte. These findings support the key role of mitofusins in modulating mitochondrial dynamics in order to meet oocyte requirements and prevent inheritance of mtDNA mutations.

**Keywords:** Mitochondrial DNA. Mitochondria. Mitochondrial fusion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da Fosforilação Oxidativa e seus Complexos.....	21
Figura 2 - O Genoma mitocondrial humano.....	22
Figura 3 - Biogênese mitocondrial durante Oogênese e Foliculogênese.....	26
Figura 4 - Mitofusinas e OPA no processo de fusão.....	29
Figura 5 - Relação da MFN2 na mitofagia induzida pelo Parkin.....	31
Figura 6 - Controle de Qualidade Mitocondrial.....	33
Figura 7 - Ilustração do processo de transferência de citoplasma.....	40
Figura 8 - Sequencia de acasalamentos.....	41
Figura 9 - Modelo Experimental.....	42
Figura 10 - Geração e quantificação da heteroplasmia da linhagem heteroplásmica B6/NZB.....	57
Figura 11 - Número de animais nascidos e curva de ganho de peso da progênie.....	59
Figura 12 - Quantidade de oócitos viáveis ovulados e porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa ou apresentando primeiro corpúsculo polar.....	61
Figura 13 - Oócitos imaturos dos grupos WT e Mfn1 cKO e ovários de todos os grupos.....	62
Figura 14 - Estudo de cópias de DNA mitocondrial.....	64
Figura 15 - Oócitos Mfn1 cKO e WT coletados aos 12 e 32 dias.....	66
Figura 16 - Agregação mitocondrial e do retículo endoplasmático evidenciam a falha no desenvolvimento de oócitos Mfn1 cKO e Mfn1&2 cKO.....	68
Figura 17 - Grau de eliminação de mtDNA NZB.....	73
Figura 18 - Distribuição de mtDNA NZB nas populações e em diferentes tecidos.....	74
Figura 19 - Nível de mtDNA NZB em oócitos GV e ao longo das gerações.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencia de primers utilizados para cálculo da heteroplasmia e número de cópias de mtDNA.....	51
---	----



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1	FOLICULOGÊNESE.....	18
2.2	A MITOCÔNDRIA.....	20
2.3	GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	21
2.4	HERANÇA MITOCONDRIAL .....	23
2.5	DINÂMICA MITOCONDRIAL, SUA IMPORTÂNCIA NO OÓCITO E NA HERANÇA .....	27
2.6	MITOFUSINAS E SUAS FUNÇÕES.....	28
2.7	MITOFUSINAS NA REGULAÇÃO MITOCONDRIAL .....	32
2.8	MODELO ANIMAL HERETOPLÁSMICO E DE MITOFUSINAS.....	34
3	HIPÓTESES.....	37
4	OBJETIVOS .....	37
4.1	OBJETIVO GERAL.....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
5.1	OBTENÇÃO DO MODELO HETEROPLÁSMICO .....	38
5.2	ACASALAMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS ANIMAIS NOCAUTE .....	38
5.3	MODELO EXPERIMENTAL .....	39
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
6.1	OBTENÇÃO DA LINHAGEM HETEROPLÁSMICA.....	44
6.2	NOCAUTE CONDICIONAL DOS GENES <i>Mfn1</i> E <i>Mfn2</i> .....	46
6.3	MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	47
6.4	GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS .....	47
6.5	ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO A TERMO .....	49
6.6	ISOLAMENTO DE OÓCITOS.....	49
6.7	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MTDNA NZB EM OÓCITOS E OUTROS TECIDOS.....	50
6.8	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA EM OÓCITOS .....	52
6.9	ANÁLISE DOS DADOS.....	52

7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
7.1	EXPERIMENTO 1: QUANTIFICAÇÃO DA HETEROPLASMIA NA LINHAGEM B6/NZB .....	55
7.2	EXPERIMENTO 2: O <i>Mfn1</i> É ESSENCIAL PARA O CRESCIMENTO DO OÓCITO.....	57
7.3	EXPERIMENTO 3: O NOCAUTE DO <i>Mfn2</i> PREJUDICA A SELEÇÃO E ELIMINAÇÃO DE MTDNA MUTANTE.....	69
8	CONCLUSÕES .....	77
9	REFERÊNCIAS.....	80
10	ANEXOS .....	98

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais a sociedade tem se preocupado e se atentado às questões relacionadas a fertilidade, acompanhada com o desenvolvimento de estudos na área. Pesquisas tanto na área básica como na clínica já têm associado a infertilidade em humanos com a função mitocondrial na regulação do desenvolvimento folicular e crescimento do oócito (VAN BLERKOM, 2011; TILLY; SINCLAIR, 2013; FRAGOULI; WELLS, 2015; WOODS; TILLY, 2015). Uma deficiência bioenergética, causada por distintos distúrbios mitocondriais, podem acarretar consequências como falhas na maturação oocitária na fecundação (REYNIER et al., 2001), divisão celular interrompida, citocinese anormal, fragmentação do embrião (VAN BLERKOM, 2004; MAY-PANLOUP et al., 2007; SHOUBRIDGE; WAI, 2007), entre outras ocorrências passíveis de provocar gravidez tardia e até a infertilidade.

Além disso, doenças ocasionadas por disfunções mitocondriais têm obtido maior reconhecimento e importância à medida que os estudos de medicina e biologia celular avançam (CHIARATTI et al., 2011). Tais doenças, em adultos, apresentam uma prevalência de 1 para 5.000 pessoas (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012) estando em graus de severidade de média a letal, geralmente tendo natureza progressiva (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; LARSSON, 2010; POULTON; BREDENOORD, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; WU et al., 2015; AIKEN et al., 2016). A ocorrência de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), como no gene *Mfn2*, por exemplo, já está associada à distintas doenças metabólicas e neurodegenerativas (SCHREPFER; SCORRANO, 2016; CHEN; CHAN, 2017). Além disso, já foi reportado que tais doenças podem ter origem no gameta (WAKAI et al., 2014). Dessa forma, é estratégico para a sociedade estudos para compreensão desses processos, almejando melhores soluções para tais patologias.

Em meio a essa realidade é de extrema importância o estudo das mitofusinas no oócito (STEWART et al., 2008b; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; CHIARATTI et al., 2011), uma vez que essas estão envolvidas no controle da dinâmica mitocondrial, regulando a forma, tamanho e número de mitocôndrias. Pouco se conhece sobre o papel das mitofusinas no oócito, mas é de se esperar que exerçam

um importante papel tanto na fertilidade quanto na herança mitocondrial devido a algumas particularidades das mitocôndrias oocitárias como o formato arredondado, excessivo número de organelas e reduzido número de cópias de mtDNA por organela. Já foi visto, por exemplo, que quando a linhagem feminina é portadora de mutação com grave efeito sobre a função mitocondrial, o mtDNA pode ser seletivamente eliminado (SATO et al., 2007; FAN et al., 2008; STEWART et al., 2008a; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014). Em tecidos somáticos já foi comprovado que as mitofusinas estão envolvidas na estabilidade do mtDNA e herança mitocondrial além de possivelmente regularem a eliminação de mitocondrias disfuncionais via autofagia. Nessas células, subsequentes eventos de fusão e fissão mitocondrial levam à segregação dos mtDNAs mutantes e selvagens (TWIG et al., 2008; TANAKA et al., 2010; SCARFFE et al., 2014). No caso da quantidade proporcional de moléculas mutantes de uma mesma mitocôndria ser elevada (dependendo da mutação), tal desequilíbrio leva a disfunção da organela; Nessa situação a célula somática é capaz de identificar e eliminar essas mitocôndrias por autofagia (e.g. mitofagia), com consequente destruição das moléculas mutantes (TWIG; SHIRIHAI, 2011). Assim, tais mecanismos de eliminação, como autofagia, poderiam estar presentes no mtDNA mutantes herdados da mãe.

Destarte, neste trabalho nos propomos a investigar o papel das mitofusinas no oócito via nocaute tecido-específico. Para tanto, genes chave para fusão mitocondrial (*Mfn1* e *Mfn2*) foram exclusivamente nocauteados em oócitos murinos contendo 2 haplótipos de mtDNA, C57BL/6 (B6) e NZB/BINJ (NZB). Oócitos selvagens (WT) ou knockouts para *Mfn1* (*Mfn1* cKO), *Mfn2* (*Mfn2* cKO) ou ambos (*Mfn1&2* cKO) foram os grupos de estudo. Nosso trabalho trata-se de estudar um modelo que visa compreender algumas questões biomoleculares envolvidas na fertilidade e herança mitocondrial no oócito, contribuindo num aspecto mais geral acerca do papel exercido pelas mitocôndrias e mitofusinas no oócito; o que tem implicação tanto para a infertilidade e soluções envolvidas nessa questão, como 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 FOLICULOGÊNESE

Quando se trata de competência de desenvolvimento embrionário, nas fêmeas a célula determinante para tal processo é o oócito. Esta não somente transmite o DNA nuclear materno (nDNA), como também o DNA mitocondrial, além de poder sofrer interferências na sua formação, como o efeito da andropausa, estresse, exercício ou a falta dele, dieta, entre outros (KEEFE; KUMAR; KALMBACH, 2015; MAY-PANLOUP et al., 2016; MELDRUM et al., 2016). Mesmo a idade da mãe, sabendo ainda que a função mitocondrial e produção energética tendem a deteriorar no envelhecimento, tem sido bastante estudada (MELDRUM et al., 2016). Desta forma se faz extremamente necessário compreender o processo pelo qual esta célula é formada.

Foliculogênese compreende a formação, crescimento e maturação folicular, tendo seu início no folículo primordial até que o mesmo se torne um folículo pré-ovulatório o que resultará na obtenção de um oócito competente para a fecundação. Para a completude adequada de tal processo é necessário o suporte das células foliculares de forma a prover nutrientes e reguladores de crescimento ao oócito; da mesma forma que o oócito também regula o crescimento folicular, evidenciando a importância da comunicação dessas células (SU et al., 2009; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012).

No início do desenvolvimento embrionário as células germinativas primordiais (PGCs) migram para regiões que formarão as gônadas. Por mitoses as PGCs formam oogônias que, desta vez por meiose, geram oócitos primários. Nesta etapa, esses oócitos estão estacionados na 1ª prófase meiótica (diplóteno). Ao nascimento um grande número desses oócitos é reduzido e os restantes são revestidos de uma camada, pré-granulosa, e passam a ser chamados de folículos primordiais. A ativação da foliculogênese se dá pelo oócito em crescimento e pela proliferação das células pré-granulosas (chamadas de granulosa quando assumem um formato cuboide). Nessa fase pré-antral a foliculogênese é independente das gonadotrofinas, sendo dirigida por estímulos parácrinos e autócrinos (SU et al., 2009; BINELLI; MURPHY, 2010).

Uma vez que as células da granulosa aumentam em número e criam novas camadas, o folículo passa a ser chamado de folículo secundário. Também é o momento no qual se inicia a formação da zona pelúcida (glicoproteínas que recobrem o oócito para proteção, por exemplo contra a poliespermia). Posteriormente os folículos são classificados como terciários ou antrais, devido a formação do antro entre as células da granulosa. O fluido do antro é derivado do soro atraído pelo gradiente osmótico entre as células da teca e o folículo. A formação do antro coincide com a aquisição de sensibilidade dos folículos ao hormônio folículo estimulante (FSH), de forma que os hormônios influenciam o desenvolvimento folicular. A formação do antro subdivide as células da granulosa em duas populações: células murais e células do cumulus. As células murais da granulosa são responsáveis pela síntese de hormônios e outros ligantes, enquanto que as células do cumulus suportam o desenvolvimento oocitário. A diferenciação dessas duas células é dada por dois gradientes opostos, o FSH e os fatores parácrinos do oócito (SU et al., 2009; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012). Dentre os fatores secretados do oócito para regulação das células do cumulus e possível desenvolvimento folicular podemos citar o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento de fibroblastos 8b (FGF8b) (SU et al., 2009).

Quando o folículo antral inicial aumenta seu volume de três a dez vezes e tem o remodelamento morfológico e bioquímico das células da teca e granulosa, ele passa a ser reconhecido como folículo pré-ovulatório. O aumento do volume se deve a proliferação das células da granulosa e expansão do antro. O oócito regula o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório pela secreção de fatores, transformadores de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), activina A e GDF9. Os fatores parácrinos do oócito e FSH são os principais ao desenvolvimento folicular nessa fase (BINELLI; MURPHY, 2010). Como resultado o folículo inicia a secreção de estradiol e inibina, assim como as células da granulosa passam a expressar receptores para o hormônio luteinizante (LHr). A inibina e o estradiol diminuem a quantidade de FSH e simultaneamente induzem a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e a consequente liberação de LH. Assim o folículo pré-ovulatório é caracterizado pela expansão do volume, bloqueio da proliferação das células da granulosa, expansão das células do cumulus e perda da comunicação oócito-cumulus por TZPs (*Transzonal Projections*). O bloqueio meiótico exercido pelas células do cumulus é perdido pela expansão das



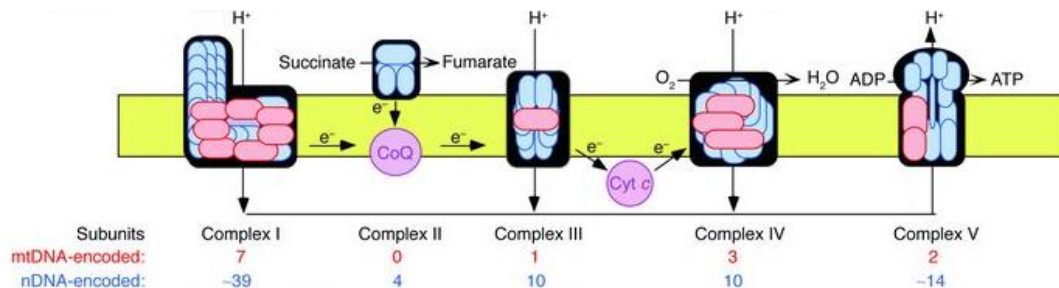
mesmas, gerando eventos de maturação nuclear e citoplasmática do oócito. A maturação nuclear é marcada pela quebra da vesícula germinativa (GVBD), progressão da divisão meiótica até metáfase II (MII) e extrusão do 1° corpúsculo polar. A maturação citoplasmática envolve a redistribuição de organelas como mitocôndrias e grânulos corticais. A expansão das células do cumulus impede que essas organelas continuem a suprir o oócito com fatores como aminoácidos, piruvato e colesterol; portanto os oócitos que não acumularam os componentes necessários durante o crescimento poderão ter sua competência comprometida, uma vez que uma reserva energética deficiente de um oócito pode inviabilizar a maturação do mesmo (VAN BLERKOM, 2011).

## 2.2 A MITOCÔNDRIA

Mitocôndrias são organelas localizadas no citoplasma de células eucarióticas, originárias de um processo evolutivo de endossimbiose entre bactérias ancestrais e células hospedeiras, tendo ocorrido há aproximadamente 2 bilhões de anos (STEWART et al., 2008b). Esta organela atua em distintos processos, como na regulação intracelular de cálcio e degradação de ácidos graxos, na apoptose e na imunidade inata (ALBERTS et al., 2010). Entretanto, sua principal função consiste na produção energética, via fosforilação oxidativa (OXPHOS), capaz de gerar 90% da energia celular (WALLACE et al., 2014).

O processo da OXPHOS (Figura 1) é um transcurso intrincado, no qual há uma alta interação entre quatro complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) que carregam elétrons provenientes da oxidação de substratos energéticos (carboidratos, lipídios e aminoácidos) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; BERGMAN; BEN-SHACHAR, 2016) A produção energética é viabilizada, em suma, por meio do acoplamento da transferência de elétrons pelos complexos à translocação de prótons ( $H^+$ ) através da membrana interna, o que leva a um gradiente eletroquímico que, por sua vez, gera uma força motriz condutora da síntese de ATP pela ATP sintase (complexo V) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005; ALBERTS et al., 2010; BERGMAN; BEN-SHACHAR, 2016). Tais complexos são constituídos por mais de 70 proteínas codificadas pelo DNA nuclear e 13 proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Figura 1 – Esquema da Fosforilação Oxidativa e seus Complexos



Fonte: Adaptado de (SCHON, 2004).

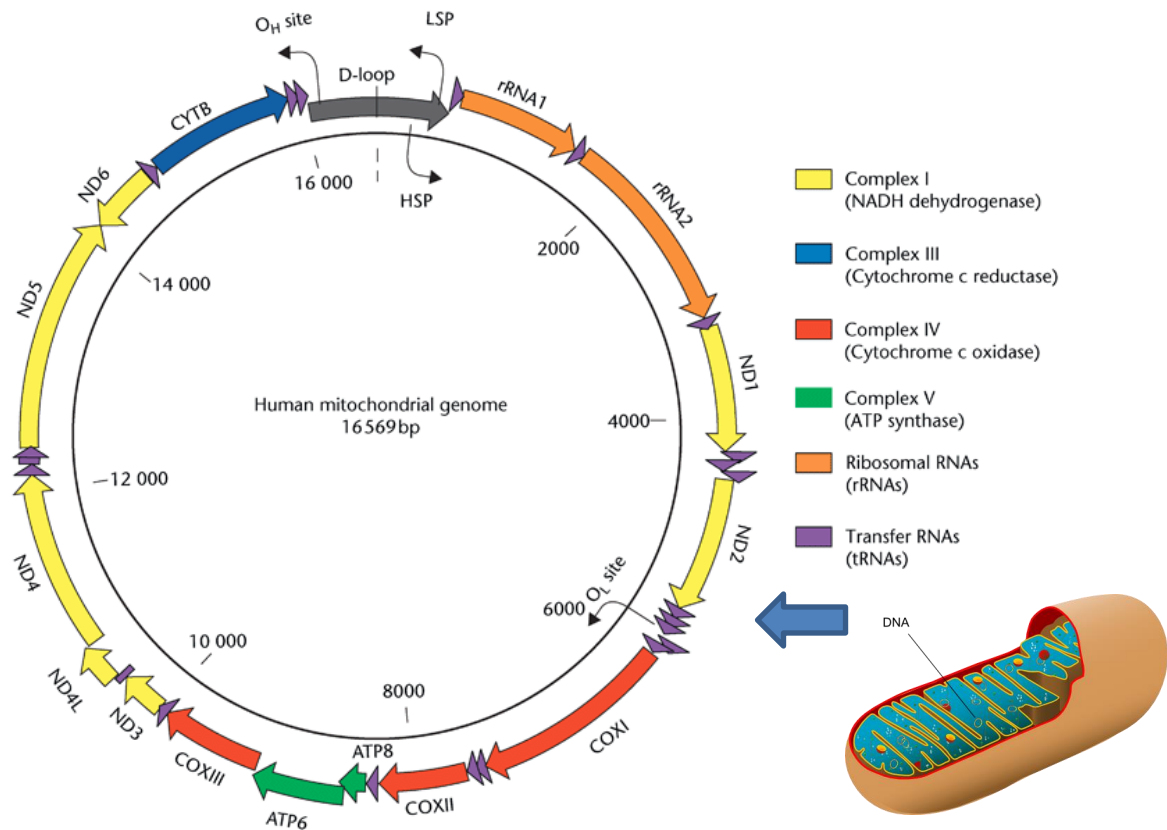
Legenda: A figura demonstra, de forma resumida, os complexos envolvidos na fosforilação oxidativa e o transcorrer de elétrons até a obtenção de trifosfato de adenosina (ATP) após a fosforilação (via gradiente de prótons) da adenosina difosfato (ADP) no complexo V. O fluxo de elétrons ocorre com auxílio dos carreadores Ubiquinona ou Coenzima Q (CoQ) e citocromo c (Cyt c), demonstrados por um círculo na imagem. Abaixo de cada complexo é possível observar o número de subunidades codificadas tanto pelo nDNA (em azul) quanto pelo mtDNA (em vermelho). Os complexos são nomeados da seguinte forma: I (NADH-coenzima Q oxidoreductase), II (Succinato-Q oxidoreductase), III (Q-citocromo c oxidoreductase), IV (Citocromo c oxidase) e complexo V ou ATP sintase.

## 2.3 GENÉTICA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é provida de seu próprio DNA (NASS, 1963a, 1963b; ALBERTS et al., 2010), o qual trata-se de uma molécula circular compacta presente na matriz mitocondrial, sendo organizada num complexo núcleo-protéico denominado nucleóide (Figura 2) (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; BOGENHAGEN, 2012). Sua constituição compacta se deve ao fato de não possuir íntrons, e poucas (limitadas a poucos nucleotídeos) ou nenhuma região intergênica. Há somente uma única região não codificadora, D-loop, que atua no controle de sua transcrição e replicação (SHADEL; ROAD; CLAYTON, 1997; TAANMAN, 1999; FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Em mamíferos, o mtDNA contém aproximadamente 16,5 kb capazes de codificar 13 RNAs mensageiros (mRNAs), 2 RNAs ribossômicos (rRNAs) e 22 RNAs transportadores (tRNAs) (TAANMAN, 1999; WALLACE, 2005; BOGENHAGEN, 2012; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Como já evidenciado, os 13 polipeptídios codificados pelo mtDNA são fundamentais para o OXPHOS e compõem, juntamente com polipeptídios codificados pelo nDNA, quatro dos cinco complexos enzimáticos da

membrana mitocondrial interna (MISHRA; CHAN, 2014).

Figura 2 - O Genoma mitocondrial humano



Fonte: Adaptado de (ST. JOHN, 2013)

Legenda: Esquema ilustrativo do mtDNA. Possui formato circular, sendo composto por duas fitas, uma pesada (H) e uma leve (L). A fita pesada codifica 12 subunidades da OXPHOS. No complexo I (NADH-Coenzima Q oxidoreductase) são os que seguem: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L e ND5). Do complexo III (CoQ-citocromo c oxidoreductase) é codificada a CYTB. Três subunidades - COX I, COX II, e COX III - provêm do complexo IV (citocromo c oxidase, ou COX); e duas subunidades - ATPase 6 e ATPase 8 - do complexo V (ATP sintase). Além destes, também são codificados dois RNAs ribossomais (rRNAs), 16-S e 12-S; como também 14 RNAs de transferência (tRNAs). Já na fita leve é codificada a subunidade ND6, co complexo 1, e oito tRNAs. Há uma região não codificadora, D-loop, que atua no controle e replicação do mtDNA. Esta contém os promotores da fita pesada e fita leve (HSP e LSP), assim como a origem da replicação da fita pesada (OH) e da fita leve (OL). A replicação do mtDNA é assimétrica, tendo início com a síntese na fita pesada até a origem da fita leve, tendo sentido anti-horário. Na figura é possível identificar por cores as subunidades codificadas em cada local, como determinado acima.

Normalmente em cada célula existem de centenas a milhares de cópias de mtDNA, e seu genoma é continuamente renovado e replicado (LARSSON, 2010). A replicação pode ocorrer a qualquer momento e de acordo com o necessidade celular,

de forma que tecidos de maior exigência energética contêm muito mais cópias do que outros tecidos (MAY-PANLOUP et al., 2007). O fato de uma célula ou até mesmo uma organela poder ter muitas cópias de mtDNA possibilita um fenômeno de complementação mitocondrial. Esse ocorre quando moléculas mutantes e selvagens coexistem numa célula (heteroplasmia), não sendo possível nos casos de homoplasmia (e.g., presença somente de moléculas selvagens). Nesse caso, tal fenômeno permite que as moléculas selvagens codifiquem de forma mais eficiente e em maior quantidade proteínas saudáveis evitando, de forma compensatória, um defeito funcional que poderia ser levado pela ação das moléculas mutantes (LARSSON, 2010; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Essa complementação é, também, favorecida pelos processos de fissão e fusão mitocondrial que viabilizam a troca de mtDNAs, RNAs e proteínas entre mitocôndrias (TWIG; SHIRIHAI, 2011; VRIES et al., 2012; BUSCH et al., 2014).

## 2.4 HERANÇA MITOCONDRIAL

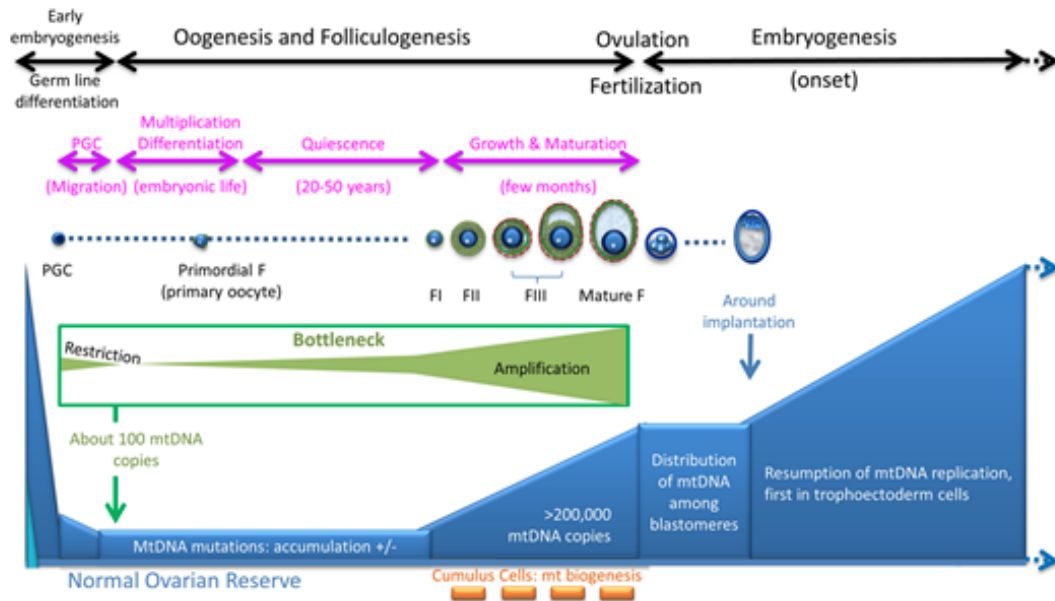
O mtDNA ainda apresenta outras particularidades quando à herança. Sabe-se que, por razão das mitocôndrias paternas (provenientes do espermatozoide) serem destruídas logo após a fecundação, a herança mitocondrial nos mamíferos é exclusivamente materna (SUTOVSKY et al., 1999; AL RAWI et al., 2011). Além disso, em um mesmo indivíduo, o mtDNA é mantido sob condição de homoplasmia, ou seja, sem variação polimórfica (WALLACE, 2005; STEWART et al., 2008b; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009). Contudo, alguns fatores podem alterar tal realidade, como a ação das espécies reativas de oxigênio (ERO). Como as mitocôndrias são sítio de atividade oxidativa intensa, elas são – por consequência – a principal fonte de ERO (WALLACE, 2005). Por conseguinte, a presença das ERO pode resultar em lesões estruturais e, se não reparadas, mutações no mtDNA tornando passível a coabitação de moléculas selvagens e mutantes dentro de uma mesma célula, condição a qual é denominada de heteroplasmia (EKERT, 1962; FOOTE, 1968; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; HARMAN, 2002; WALLACE, 2005; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; KOWALTOWSKI et al., 2009; ALBERTS et al., 2010; LARSSON, 2010; OGILBY, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Em

consequência da alta susceptibilidade do mtDNA a ocorrência de mutações, além de outros fatores, mutações patogênicas no mtDNA estão presentes em uma a cada 200 pessoas (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; POULTON et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Tais mutações geradas no mtDNA são, em sua maioria, de caráter recessivo, de forma que para causar um detrimento significativo na função mitocondrial da célula em questão é preciso que grande parte das cópias de mtDNA sejam mutadas, o que varia de acordo com a mutação e tipo celular (CHAN, 2006a, 2006b).

Nos casos de heteroplasmia há uma forte tendência de se restabelecer a homoplasmia, por rápida segregação, após poucas gerações (HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; JENUTH et al., 1996; MEIRELLES; SMITH, 1997; STEWART et al., 2008b; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009). Os mecanismos para que tal segregação ocorra foram relatados primeiramente em bovinos (KOEHLER et al., 1991), observando que descendentes de uma mesma mãe heteroplásmica são passíveis de apresentarem níveis variados da mutação entre si e também em relação a sua mãe (CHIARATTI et al., 2011). Foi visto inclusive que uma mãe, tendo baixa quantidade de mtDNA mutado, pode gerar descendentes praticamente homoplásmicos para a forma selvagem de mtDNA (CHIARATTI et al., 2011; MISHRA; CHAN, 2014). Isso se deve a ocorrência de um gargalo genético mitocondrial (Figura 3) que reduz rapidamente os mtDNAs polimórficos (HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; JENUTH et al., 1996; CAO et al., 2007; CREE et al., 2008; STEWART et al., 2008b; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008; CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009). A teoria do gargalo genético mitocondrial defende a existência de dois movimentos subsequentes que promovem a segregação mitocondrial. Num primeiro momento do desenvolvimento da linhagem germinativa da fêmea o mtDNA é intensamente replicado, atingindo cerca de 200.000 cópias no oócito maturo (MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982). Posteriormente, acredita-se que não haja replicação do mtDNA desde o momento da fecundação do oócito até o sétimo dia do desenvolvimento embrionário de forma que restem poucas cópias de mtDNA a serem segregadas nos diferentes tipos celulares do embrião, incluindo as PGCs (PIKÓ; TAYLOR, 1987; JENUTH et al., 1996; CREE et al., 2008; WAI et al., 2010). A grande redução do número de cópias de mtDNA que ocorre durante essa etapa do desenvolvimento embrionário, juntamente com a seleção de poucas células a darem origem às PGCs, resultam numa alta segregação

já que um reduzido e seletivo grupo de moléculas deverá povoar os oócitos da próxima geração (JENUTH et al., 1996; CREE et al., 2008; STEWART et al., 2008b; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Esse intenso movimento de segregação e purificação visando a restauração rápida da homoplasma em poucas gerações já foi bem exemplificado em estudos (STEWART et al., 2008a), no qual utilizaram camundongos machos de linhagem portadora de uma DNA polimerase mitocondrial defeituosa (PolgA<sup>D257A</sup>) para serem acasalados com fêmeas selvagens de forma a introduzir mutações no mtDNA. Após duas gerações de retrocruzamentos, fêmeas descendentes foram acasaladas com machos selvagens para eliminar a mutação nuclear PolgA<sup>D257A</sup> e estudar o padrão de herança das mutações introduzidas no mtDNA. Nesse estudo, constataram uma seleção negativa mais intensa contra mutações em genes codificantes de proteínas do que em genes codificantes de tRNAs e rRNAs, evidenciando uma atividade de seleção genética. Pela seleção se comportar dessa maneira pode-se explicar porque, em humanos, mutações mitocondriais geradoras de patologias familiares leves são frequentes enquanto que as causadas por grandes deleções são esporádicas (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Além dessa, outras pesquisas já demonstraram a segregação e mecanismos de herança mitocondrial (RAHMAN et al., 2001; RAJASIMHA; CHINNERY; SAMUELS, 2008; MALENA et al., 2009; FREYER et al., 2012; SHARPLEY et al., 2012a), assim como já observaram o comportamento da seleção ser dependente do efeito da mutação sobre a função mitocondrial (STEWART et al., 2008b).

Figura 3 – Biogênese mitocondrial durante Oogênese e Foliculogênese



Fonte: Adaptado de (MAY-PANLOUP et al., 2016).

Legenda: A figura representa de forma resumida a biogênese mitocondrial que ocorre durante os processos de oogênese, foliculogênese e início do desenvolvimento embrionário. Na imagem, a letra F indica folículo seguidos de I indicando primário, II indicando secundário e III indicando terciário. De forma geral, no decorrer da embriogênese, o número de cópias de mtDNA de cada célula embrionária é bastante reduzido. Por sua vez, na oogênese, ocorre um processo de gargalo genético (em verde), no qual há uma restrição (queda) e amplificação do número de cópias de mtDNA, de forma que apenas um *pool* seletivo de moléculas seja multiplicado. Essas cópias que passaram por tal processo, então se distribuem nos blastômeros. Para a construção desse *pool* seletivo, também deve-se considerar uma significativa relação entre as células da granulosa e o oócito (representada em laranja).

Outro aspecto da heteroplasma do mtDNA é bem observada em tecidos somáticos. Nesses já foi constatado que a heteroplasma é passível de significativa variação, de forma tecido específica, ao longo do tempo (TAANMAN, 1999; LARSSON, 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Diversos estudos têm confirmado que mutações no mtDNA que levam a disfunção mitocondrial são eliminadas em células germinativas, por mecanismos ainda não muito conhecidos, mais eficientemente do que mutações “neutras”, como importante mecanismo de controle e reparação celular (JENUTH et al., 1996; BROWN et al., 2001; SATO et al., 2007; FAN et al., 2008; STEWART et al., 2008a; POULTON et al., 2010; FREYER et al., 2012; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O’FARRELL, 2014). Também observaram uma seleção mais intensa de mutações ocorridas em

genes codificadores de proteínas, do que genes codificadores de tRNAs e rRNAs (STEWART et al., 2008a), corroborando com a observação de maior seleção e reparação de mutações de acordo com o detrimento que pode ser causado na função organelar. Apesar dos mecanismos não serem muito conhecidos, estudos têm explorado hipóteses de seleção e eliminação das mutações tanto em nível celular como organelar; como da seleção purificadora, eliminando as mitocôndrias paternas por autofagia, o que poderia ocorrer também com mitocôndrias mutantes (SUTOVSKY et al., 1999, 2000; AL RAWI et al., 2011) ou uma eliminação de mitocôndrias a partir de sua deficiência funcional (SHOUBRIDGE; WAI, 2008; STEWART et al., 2008b; HILL; CHEN; XU, 2014; MA; XU; O'FARRELL, 2014).

## 2.5 DINÂMICA MITOCONDRIAL, SUA IMPORTÂNCIA NO OÓCITO E NA HERANÇA

Mitocôndrias são organelas dinâmicas, capazes de remodelar suas membranas em ciclos de fusão e fissão, afetando sua forma, o tamanho e o número de organelas (CHAN, 2012). Tais processos viabilizam a troca e mistura de materiais entre elas (como mtDNA, RNAs e proteínas), capacidade a qual é reconhecida como crucial para manutenção da integridade do mtDNA e função mitocondrial (MISHRA; CHAN, 2014). Em consonância com a gerência da integridade mitocondrial, seu dinamismo também interfere na herança e na segregação do genoma mitocondrial.

O balanço entre fusão e fissão mitocondrial ocorre de forma recorrente, alterando a conformação mitocondrial dependendo do equilíbrio com que esses eventos ocorrem. Quando a fusão é favorecida, a união de organelas vizinhas favorece o alongamento mitocondrial, tubular, sendo que esse processo está relacionado a manutenção do conteúdo do mtDNA, heterogeneidade de nucleóides e atividade mitocondrial (ISHIHARA et al., 2009; MISHRA; CHAN, 2014). Por sua vez, a fissão resulta em mitocôndrias circulares, menores e fragmentadas, tendo sido relacionada com a facilitação do transporte mitocondrial, apoptose e mitofagia (CHEN et al., 2003, 2010; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; MISHRA; CHAN, 2014). Ambos eventos devem ocorrer de forma específica e equilibrada visando garantir a integridade celular.

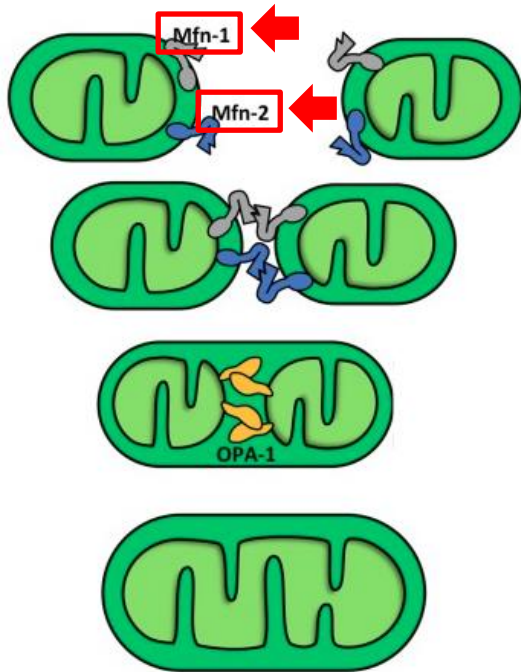


Visto que a dinâmica mitocondrial é capaz de alterar a conformação e o número de organelas, ela deve ser determinante para a segregação e herança mitocondrial no oócito e início do desenvolvimento embrionário (CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; ISHIHARA et al., 2009; CHEN et al., 2010; CHEN; CHAN, 2010). Durante a oogênese, como dito acima, o número de cópias do mtDNA passa por grande aumento, chegando a 250.000 cópias (MICHAELS; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; CAO et al., 2007; CREE et al., 2008; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Devido provavelmente a um desbalanço da fusão em favor da fissão mitocondrial, essas moléculas são partilhadas entre ~100.000 mitocôndrias (CHEN et al., 2003; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CAO et al., 2007). Esse evento recebe o nome de meiose mitocondrial, devido ao reduzido número de cópias de mtDNA (e.g., 1 a 2 cópias) presente nas mitocôndrias de oócitos (JANSEN; DE BOER, 1998; CAO et al., 2007). A baixa densidade de mtDNA por organela favorece sua segregação entre as células do embrião em desenvolvimento (JENUTH et al., 1996; CAO et al., 2007; CREE et al., 2008; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008). Ademais, esta condição possivelmente impede a complementação mitocondrial, favorecendo a eliminação de mtDNAs mutantes com base no seu efeito sobre a função mitocondrial. Isso seria possível por meio da autofagia dirigida a mitocôndrias disfuncionais (e.g., mitofagia), como já comprovado em tecidos somáticos (CHAN, 2006a; SATO et al., 2007; FAN et al., 2008; STEWART et al., 2008b, 2008a; CHIARATTI et al., 2011).

## 2.6 MITOFUSINAS E SUAS FUNÇÕES

As mitofusinas MFN1 e MFN2 (FIGURA 4) são proteínas homólogas da família proteica ligada às dinaminas (DRPs), sendo principalmente responsáveis pela fusão mitocondrial. Esse grupo proteico sequestra e hidrolisa GTP (GTPase), liberando energia para o processo de modelagem de membranas mitocondriais (VAN DER BLIEK, 1999; DANINO; HINSHAW, 2001; SANTEL et al., 2003; PRAEFCKE; MCMAHON, 2004; HOPPINS; LACKNER; NUNNARI, 2007). A fusão mitocondrial se dá primeiramente pela fusão das membranas externas, sendo este processo mediado pelos genes *Mfn1* e *Mfn2*, enquanto a fusão das membranas internas é regulada pelo gene da atrofia óptica (*Opa1*) (MISHRA; CHAN, 2014).

Figura 4 – Mitofusinas e OPA no processo de fusão



Fonte: Adaptado de (CHIONG et al., 2014).

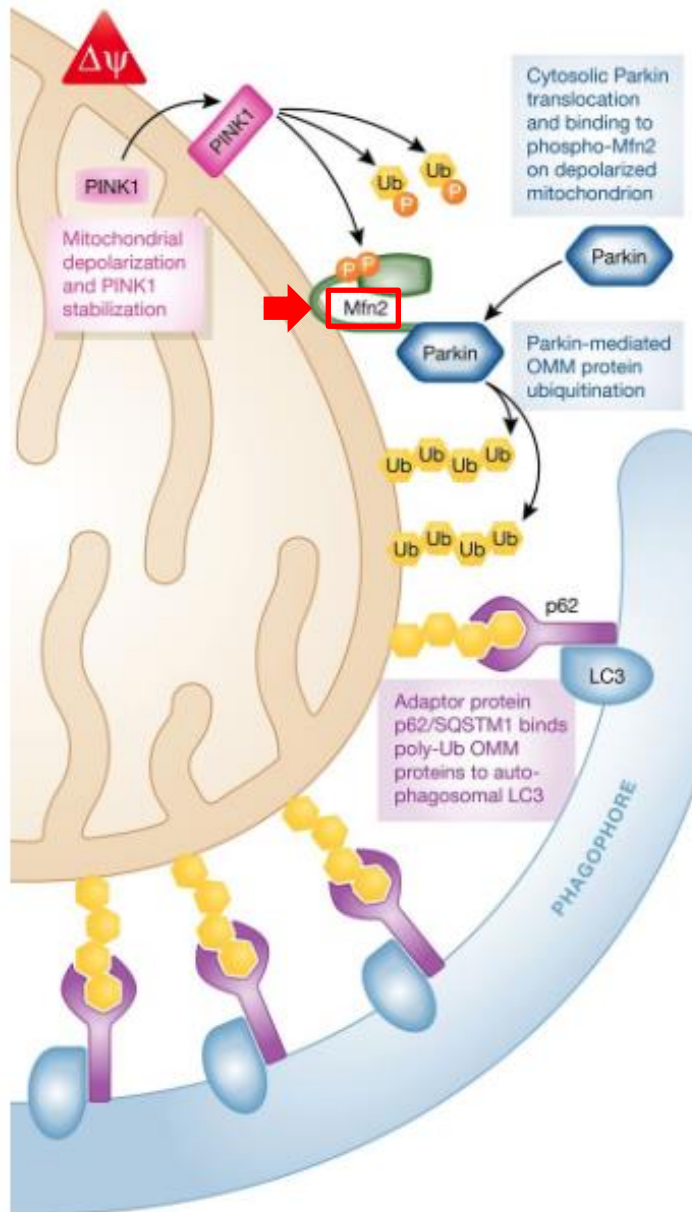
Legenda: Figura ilustrativa demonstrando o processo de fusão, regulando a morfologia e dinâmica mitocondrial. Tal ocorre primeiramente com ação das mitofusinas (MFN1 e 2), na membrana externa mitocondrial e posterior ação da atrofia óptica (OPA1) na membrana interna. Ambas mitofusinas são GTPases localizadas na membrana mitocondrial externa (OMM). A região da bobina enrolada C-terminal de *Mfn-1* e *Mfn-2* medeia a ligação entre mitocôndrias por meio de complexos homotípicos ou heterotípicos formados entre mitocôndrias adjacentes. Tal interação medeia a fusão do OMM. Já a OPA-1 é uma proteína relacionada à dinamina localizada na membrana mitocondrial interna (IMM). Esta participa do anexo e fusão do IMM.

MFN1 e MFN2 são parecidas em termos estruturais, ambas formam homo e heterodímeros, e possuem algumas funções semelhantes (DETMER; CHAN, 2007). Além das mitofusinas terem papel fundamental na fusão mitocondrial, estudos têm demonstrado evidências do envolvimento dessas em outras funções. A MFN1 possui maior afinidade por GTP (ISHIHARA; EURA; MIHARA, 2004), sendo encontrada somente em mitocôndrias (LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014). Acredita-se que a MFN1 atue primeiramente, na ancoragem das mitocôndrias (CHEN et al., 2003; CIPOLAT et al., 2004). Além disso, as duas mitofusinas interagem com outras organelas de forma distinta, inclusive sendo expressas em maior ou menor quantidade

dependendo do tipo celular (SCHREPFER; SCORRANO, 2016). A MFN2 é descrita como uma importante reguladora do metabolismo energético (ZORZANO et al., 2015), do transporte mitocondrial (NI; WILLIAMS; DING, 2015) e da mitofagia. Além disso, a MFN2 também está presente na membrana do retículo endoplasmático (RE), exercendo importante papel na regulação da morfologia e função do mesmo (SCHREPFER; SCORRANO, 2016).

O papel do *Mfn2* na regulação da mitofagia parece estar associado com a atração de Parkin (Figura 5) para as mitocôndrias disfuncionais (MISHRA; CHAN, 2014). Nesta via participam as proteínas PINK1 (*PTEN- induced putative kinase protein 1*) e Parkin, onde PINK1 é normalmente importada pela mitocôndria e degradada em seu interior (NI; WILLIAMS; DING, 2015). No caso de uma mitocôndria despolarizada, PINK1 se acumula no interior desta e fosforila a MFN2 (NI; WILLIAMS; DING, 2015). Parkin é, então, recrutada do citoplasma e poli-ubiquitina a MFN2 e outras proteínas da membrana externa. Por consequência, outros complexos, histona deacetilase 6 (HDAC6) e o sequestosome 1 (P62/SQSTM1) são atraídas e interagem com os domínios de poli-ubiquitinação mitocondrial e com componentes dos autofagossomos como a forma lipidada de Map1lc3b (LC3). A LC3 está presente na membrana dos autofagossomos (LC3-II) em sua forma lipidada. Como consequência, a mitocôndria é engolfada pelo autofagossomo e encaminhada para destruição nos lisossomos (NI; WILLIAMS; DING, 2015).

Figura 5 – Relação da MFN2 na mitofagia induzida pelo Parkin



Fonte: Adaptado de (DORN, 2015).

Legenda: No modelo apresentado uma mitocôndria danificada e despolarizada, seja pela presença de mutações no mtDNA ou outro motivo, leva ao acúmulo de PINK1, fosforilação de MFN2 e recrutamento do Parkin na membrana mitocondrial externa. Parkin poli-ubiquitina as várias proteínas da membrana mitocondrial externa, levando à degradação da organela.

A mitofusina 2 também desempenha uma importante função no tocante a comunicação entre a mitocôndria e o RE. Sabe-se que o RE é responsável pela síntese, dobramento e transporte de proteínas secretórias e de membrana. Também atua no armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  e na biossíntese de lipídeos. O RE possui locais de

contato com outras organelas citoplasmáticas, incluindo a membrana mitocondrial externa. Esses contatos são bem caracterizados, sendo esta região de contato denominada MAM (mitochondrial-associated membranes), a qual é importante na regulação do metabolismo lipídico e na sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$  (ZORZANO et al., 2015). Esta conexão das membranas reticular e mitocondrial é mediada pelo *Mfn2*, estando presente em ambas (ZORZANO et al., 2015). A MAM é rica em receptores de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE (receptores inositol 1,4,5-trifosfato, IP3) e transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriais (VDAC). Dessa forma, o *Mfn2* atua na manutenção bioenergética mitocondrial, na regulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e na indução de apoptose (ZORZANO et al., 2015; SCHREPFER; SCORRANO, 2016). Como as membranas formadoras de autofagossomos têm origem na MAM, o *Mfn2* também afeta a formação dos autofagossomos (HAILEY et al., 2010), a fusão destes com lisossomos (ZHAO et al., 2012), sendo tais processos associados à mitofagia e lipofagia (NI; WILLIAMS; DING, 2015).

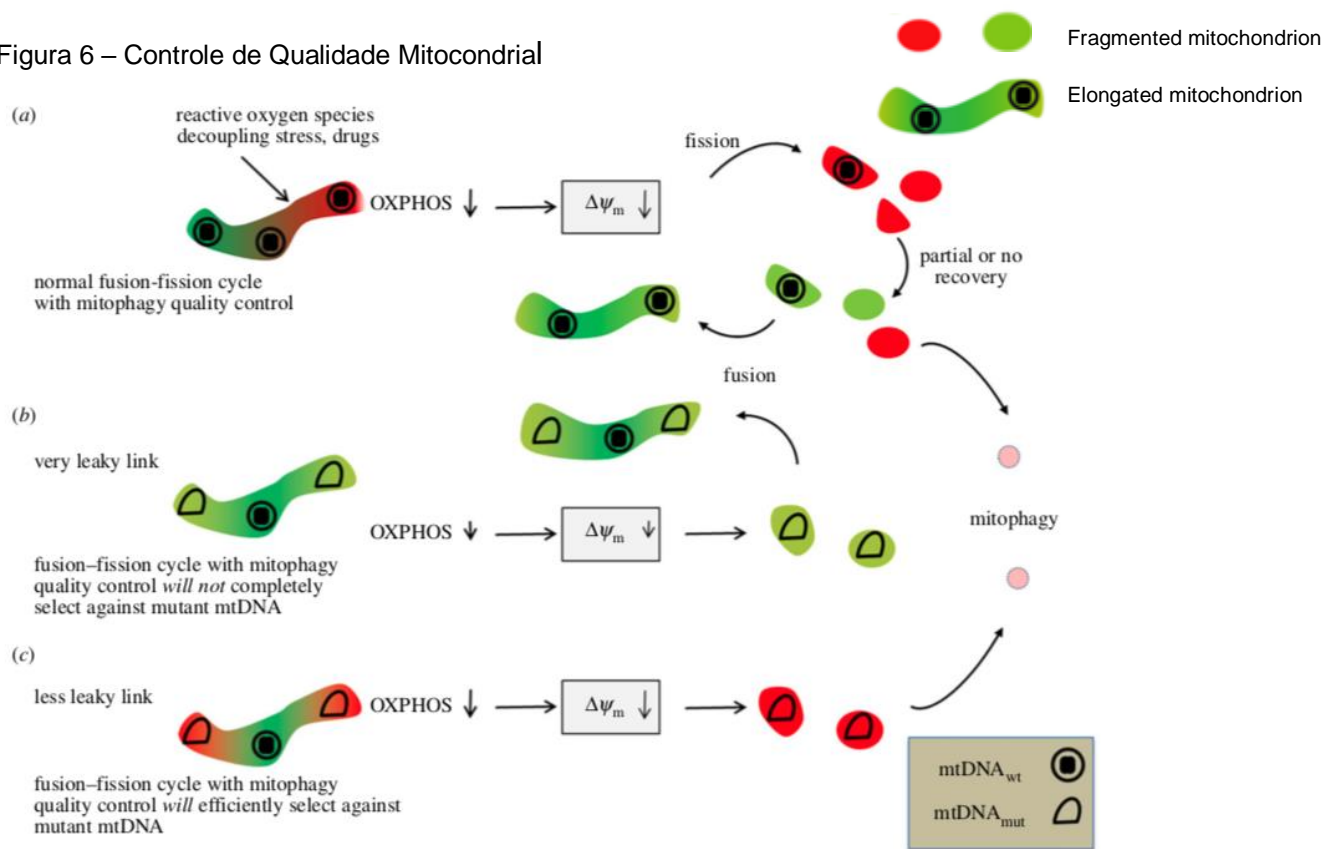
## 2.7 MITOFUSINAS NA REGULAÇÃO MITOCONDRIAL

Dentre as teorias estudadas para eliminação de mtDNA mutante, uma das mais investigadas é o processo de autofagia (ou mitofagia, no caso das mitocôndrias). Como descrito acima, as mitofusinas, em especial a MFN2, participa tanto na formação de autofagossomos como também na regulação da mitofagia, podendo ser importante controle na qualidade mitocondrial. Se verdadeiro esse processo é iniciado uma vez que mitocôndrias disfuncionais apresentam elevadas concentrações de ERO, baixo potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) e diminuição da proteína de fusão OPA1, resultando na translocação de PINK1 e recrutamento de Parkin de forma a desencadear o processo autofágico (SUEN et al., 2010; TWIG; SHIRIHAI, 2011; YANG; YANG, 2011; YOULE; NARENDRA, 2011; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; VRIES et al., 2012; DAI et al., 2014; SCARFFE et al., 2014).

O processo de autofagia já foi identificado e descrito ao longo do desenvolvimento embrionário tanto na eliminação de mitocôndrias paternas como também em alguns fatores maternos herdados via oócito (SUTOVSKY et al., 1999, 2000; TSUKAMOTO et al., 2008; AL RAWI et al., 2011). A evidente presença dessa

maquinaria no embrião, somada a algumas características particulares das mitocôndrias no oócito, como seu formato arredondado (característica indicativa de baixa atividade de fusão) e presença de somente uma a duas moléculas de mtDNA por organela (PIKÓ; CHASE, 1973; PIKÓ; TAYLOR, 1987; CAO et al., 2007; SHOUBRIDGE; WAI, 2007; CHIARATTI; MEIRELLES, 2010) reforça a hipótese da existência da mitofagia como recurso de eliminação de moléculas mutantes via identificação de mitocôndrias disfuncionais. Dessa maneira a mitocôndria teria um elaborado e complexo controle de qualidade (FIGURA 6) visando garantir o funcionamento organelar.

Figura 6 – Controle de Qualidade Mitocondrial



Fonte: Adaptado de (BUSCH et al., 2014).

Legenda: O esquema ilustrativo demonstra a ligação genótipo-fenótipo como mecanismo de controle de qualidade mitocondrial, identificando mitocôndrias disfuncionais e as eliminando por mitofagia. Na situação (a) as mitocôndrias com mtDNA do tipo selvagem podem sofrer despolarização (espontânea ou induzida), mas a recuperação seguida pela fusão os traz de volta à rede mitocondrial dinâmica. Na situação (b) a presença de mtDNA mutante próximo ao mtDNA do tipo selvagem na mesma mitocôndria permitiria a complementação funcional intramitocondrial. Enquanto a diminuição da força motriz do próton (PMF) e do potencial de membrana, respectivamente, não for muito severa, a eliminação por mitofagia não funcionará e o mtDNA mutante pode escapar ao controle de qualidade. Na situação (c) a fissão pode gerar fragmentos com baixa PMF, incapaz de se fundir novamente, propenso a ser eliminado por autofagossomos.

## 2.8 MODELO ANIMAL HERETOPLÁSMICO E DE MITOFUSINAS

Ainda hoje não há muitos modelos animais para o estudo de herança mitocondrial e doenças mitocondriais. Contudo, um modelo bem explorado pela comunidade científica é a linhagem heteroplásmica de camundongos B6/NZB (C57BL/6-NZB/BINJ) (JENUTH et al., 1996; JENUTH; PETERSON; SHOUBRIDGE, 1997; MEIRELLES; SMITH, 1997, 1998; BATTERSBY; LOREDO-OSTI; SHOUBRIDGE, 2003; BAYONA-BAFALUY et al., 2005; CREE et al., 2008; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008; SHARPLEY et al., 2012a; MACHADO et al., 2015). O desenvolvimento da mesma é obtido por artifício da transferência de citoplasma entre embriões contendo mtDNA de ambas linhagens amplamente difundidas, NZB/BINJ (NZB) e C57BL/6 (B6).

O mtDNA da linhagem NZB difere da linhagem B6 em 91 nucleotídeos (MORENO-LOSHUERTOS et al., 2006), capazes de levar a mutações geradoras de defeitos mitocondriais, alterando o fenótipo cognitivo e comportamental dos animais (JOHNSON et al., 2001; ROUBERTOUX et al., 2003; SHARPLEY et al., 2012a). Esses efeitos são possivelmente ocasionados por um menor desempenho da OXPHOS devido a um polimorfismo no gene *mt-Tr* que afeta a codificação de um tRNA de arginina e, conseqüentemente, altera a função mitocondrial (MORENO-LOSHUERTOS et al., 2006). Além disso, sob condições normais de cultivo, o número de cópias de mtDNA é maior em células homoplásmicas de mtDNA NZB do que em células com mtDNA B6, o que seria um efeito compensatório da célula uma vez que é exposta a condição de mutação no mtDNA NZB. Tal resposta compensatória está relacionada com a maior produção de ERO por estas células.

Este modelo animal tem sido empregado em diversas áreas de interesse, como, por exemplo, no estudo na herança mitocondrial (BATTERSBY; LOREDO-OSTI; SHOUBRIDGE, 2003; SHARPLEY et al., 2012a; MACHADO et al., 2015). Recentemente, Sharpley *et al.* (SHARPLEY et al., 2012a), demonstraram que fêmeas B6/NZB produzem descendentes com níveis reduzidos de mtDNA NZB, o que sugere que o mtDNA NZB é identificado pelo organismo como mutante e eliminado na linhagem germinativa. O reconhecimento de que o mtDNA NZB causa prejuízo a

função mitocondrial e, portanto, pode ser seletivamente eliminado, tem possibilitado um uso ainda mais amplo da linhagem B6/NZB.

Além dos estudos focados em heteroplasmia, diversas pesquisas têm sido realizadas buscando compreender a função das proteínas ligadas à dinâmica mitocondrial. Dessa forma, tanto o nocaute como a superexpressão dessas proteínas são ferramentas exploradas (UDAGAWA et al., 2014; WAKAI et al., 2014). Foi mostrado, por exemplo, que a perda de DRP1 (uma GTPase envolvida na fissão mitocondrial) induziu a morte de embriões murinos do dia 12.5 (ASHRAFIAN et al., 2010). Outro estudo ainda mostrou que camundongos envelhecidos possuem menor atividade de DRP1, levando a defeitos morfogênicos nos oócitos (UDAGAWA et al., 2014). Um método bastante difundido para modelar a expressão gênica de forma tecido específica é através da recombinase de DNA específica para o local Cre em camundongos (LEWANDOSKI; WASSARMAN; MARTIN, 1997; DE VRIES et al., 2000; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; SUN; LIU; KIKUCHI, 2008). De forma geral, a Cre medeia a recombinação de dois locais alvo, denominados loxP, que envolvem o gene alvo. Há, então, a excisão do segmento de DNA flanqueado pelos locais loxP. Esta tecnologia pode tanto ativar ou desativar um gene. Para obtenção dos animais com o gene de interesse, *in vivo*, são acasalados dois animais, um sendo portador do gene alvo – sendo este envolto pelos locais loxP- e outro animal portador de um transgene cre. Em diversos estudos, assim como feito neste projeto, a expressão da Cre foi controlada pelo gene da zona pelúcida 3 (*Zp3*) de camundongo, uma vez que este é exclusivamente expresso no oócito em crescimento (iniciando entre folículo primário e secundário) (LEWANDOSKI; WASSARMAN; MARTIN, 1997; DE VRIES et al., 2000; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; SUN; LIU; KIKUCHI, 2008)..

Assim, muitas pesquisas têm se utilizado, com sucesso, de tais modelos animais de forma a compreender tanto os processos envolvidos na herança como na dinâmica mitocondrial. Neste estudo, nosso grupo produziu e manteve linhagens heretoplásmicas e nocaute para as mitofusinas, como melhor explicado no material e métodos.



# **HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### 3 HIPÓTESE

Uma vez que a as mitocôndrias no oócito já se apresentam em uma morfologia característica de maior taxa de fissão (pequena e arredondada), a parada da fusão otimiza e favorece a segregação e eliminação do mtDNA NZB.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fusão (mitofusinas) sobre a oogênese e a herança mitocondrial.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver uma linhagem de camundongos heteroplásmicos com mtDNA originado das linhagens C57BL/6N e NZB/BINJ.
- b) Analisar a capacidade de desenvolvimento a termo, o número de animais nascidos e o ganho de peso da progênie de fêmeas portadoras de oócitos selvagens (WT) ou nocaute para *Mfn1* (*Mfn1* cKO), *Mfn2* (*Mfn2* cKO) ou duplo nocaute (*Mfn1&2* cKO).
- c) Avaliar o número de oócitos ovulados, o diâmetro oocitário e a função mitocondrial (número de cópias de mtDNA e distribuição mitocondrial) nos oócitos de fêmeas contendo oócitos WT, *Mfn1* cKO, *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO.
- d) Analisar o nível de mtDNA NZB nos oócitos (maturados e imaturos) e nos tecidos somáticos da progênie (na orelha ao desmame e na cauda, baço e fígado aos 100 dias de idade) de fêmeas contendo oócitos WT, *Mfn1* cKO, *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO.

## 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente projeto de doutorado foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LAGENBIO), localizado no Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O mesmo foi elaborado como projeto base de um projeto de Jovem Pesquisador do professor Dr. Marcos Roberto Chiaratti, intitulado “Bases moleculares da herança mitocondrial: o papel da fusão mitocondrial” (Jovem Pesquisador - FAPESP 2012/50231-6). Todos os experimentos obtiveram aprovação tanto do comitê de ética da Universidade de São Paulo, como da Universidade Federal de São Carlos. Cada análise foi realizada tendo em vista o objetivo central do efeito da fusão sobre a fertilidade e herança mitocondrial.

### 5.1 OBTENÇÃO DO MODELO HETEROPLÁSMICO

Para a realização do primeiro objetivo do trabalho, desenvolvendo um modelo heteroplásmico, foi realizada a técnica de transferência de citoplasma, seguida da transferência de embrião em uma fêmea receptora, como ilustrado no esquema abaixo (FIGURA 7). Na sequência essa linhagem foi mantida sempre com a análise da heteroplasmia dos animais, como melhor explicado nos materiais e métodos.

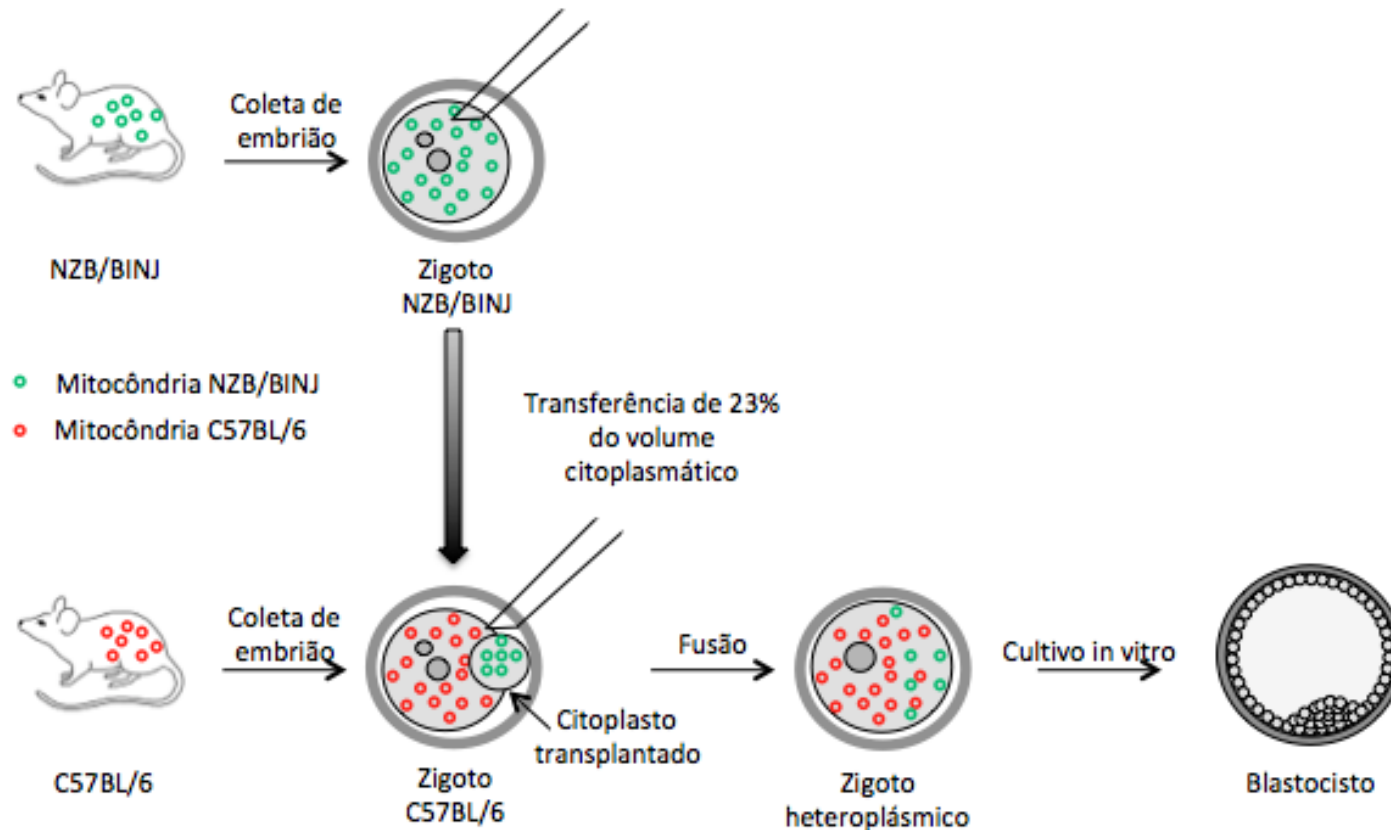
### 5.2 ACASALAMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS ANIMAIS NOCAUTE

Para os demais objetivos do trabalho, obtendo os quatro grupos experimentais, foi realizada uma sequência de acasalamentos (FIGURA 8), detalhada nos materiais e métodos, que também foi mantida no biotério. Todas as linhagens e manipulações foram aprovadas pelo comitê de ética.

### 5.3 MODELO EXPERIMENTAL

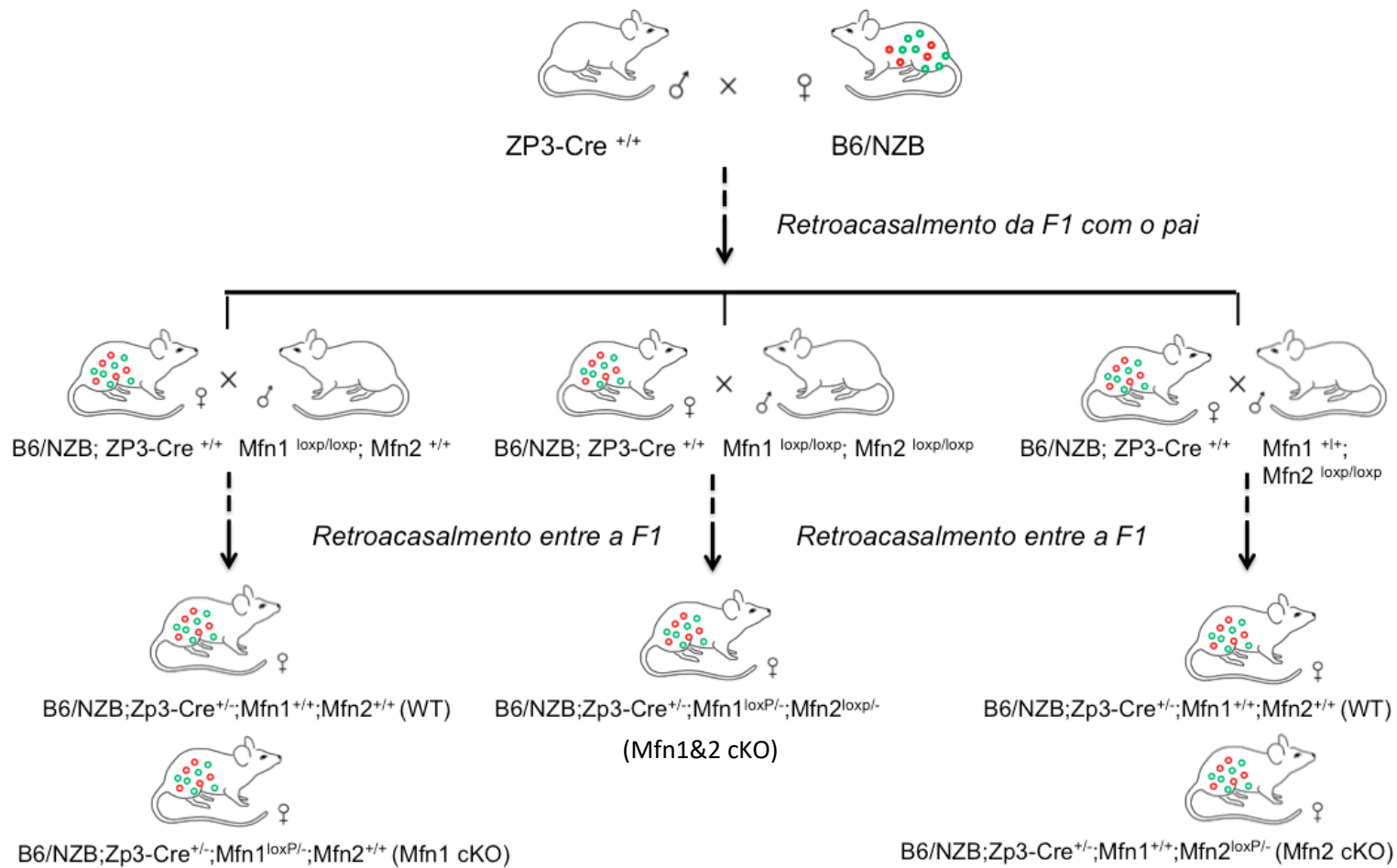
Uma vez que o modelo animal foi obtido, realizamos o delineamento experimental como ilustrado no esquema abaixo (FIGURA 9).

Figura 7 - Ilustração do processo de transferência de citoplasma



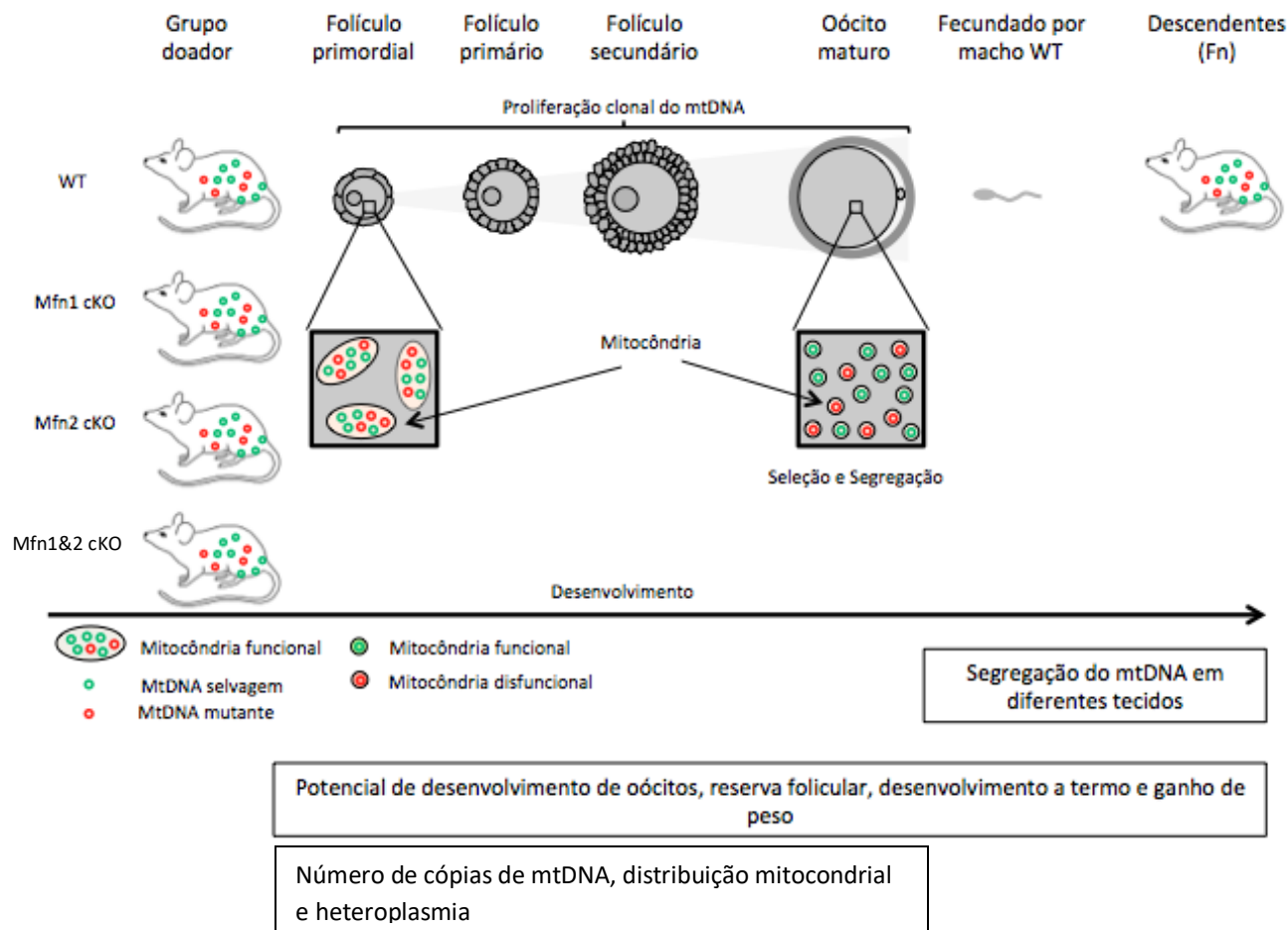
Legenda: Para a realização da microcirurgia para produção de embriões heteroplásmicos foi utilizado um microscópio invertido com micromanipuladores. Resumidamente, o procedimento foi baseado em um protocolo já bem padronizado. Uma biópsia citoplasmática de aproximadamente 30% do volume do embrião foi removida dos zigos NZB e introduzida no espaço perivitelínico dos zigos B6, do qual foi retirado previamente um volume citoplasmático semelhante. A posteriori, tais zigos manipulados foram expostos a um único pulso elétrico. Os zigos fundidos foram selecionados e cultivados até o estágio de blastocisto. Então foram transferidos para o oviduto de fêmeas Swiss acasaladas com machos Swiss vasectomizados. Tal procedimento é melhor detalhado nos materiais e métodos.

Figura 8 - Sequencia de acasalamentos



Legenda: Para a obtenção dos animais nocaute para as mitofusinas foi realizada uma sequencia de acasalamentos, detalhada nos materiais e métodos. A primeira etapa consistiu em obter de animais da linhagem heretoplásmica estáveis. Posteriormente houve o acasalamento de fêmeas heteroplásmicas com machos Zp3-Cre<sup>+/+</sup> para a inserção da cre recombinase. Então as fêmeas com a cre, foram acasaladas com machos loxp. Por fim, subsequentes acasalamentos das gerações seguintes foram realizados para obtenção dos quatro grupos experimentais de interesse (WT, Mfn1 cKO, Mfn2 cKO e Mfn1&2 cKO).

Figura 9 – Modelo Experimental



Legenda: O esquema ilustra o delineamento experimental do projeto com as análises propostas e em que momento do desenvolvimento essas foram realizadas. Analisamos o potencial de desenvolvimento dos oócitos, reserva folicular, desenvolvimento a termo e ganho de peso. Também avaliamos da fase de folículo primordial até oócito maduro, o conteúdo de ATP, número de cópias de mtDNA, distribuição mitocondrial e heteroplasmia. Por fim, estudamos a segregação do mtDNA em diferentes tecidos. Todas as análises foram feitas nos quatro grupos experimentais, WT, Mfn1 cKO, Mfn2 cKO e Mfn1&2 cKO.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 OBTENÇÃO DA LINHAGEM HETEROPLÁSMICA

Primeiramente, camundongos contendo mtDNA de origem NZB foram obtidos por retrocruzamento, por cinco gerações, de fêmeas puras NZB com machos B6 (MEIRELLES; SMITH, 1997). Por haver eliminação do mtDNA paterno após fecundação (herança materna), esses camundongos continham mtDNA exclusivamente NZB sobre um genoma nuclear ~97% B6 (puros por cruzar). Camundongos contendo mtDNA de origem B6 foram obtidos de fêmeas F1 a partir de um acasalamento entre fêmeas B6 e machos da linhagem CBA. Essas fêmeas contendo mtDNA NZB ou B6 serão daqui em diante chamadas de NZB e B6, respectivamente.

Para a coleta de zigotos os animais foram superovulados por injeção intra-peritoneal com 5 U.I de gonadotrofina equina corionica (eCG; Folligon, MSD Animal Health, Summit, USA) e 5 U.I de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorullon, MSD Animal Health) com um intervalo de 46–47 horas entre as injeções (NAGY et al., 2003). Após a injeção de hCG, as fêmeas foram pareadas para acasalamento com machos F1 (derivados dos acasalamentos entre fêmeas B6 e machos CBA) e tiveram verificadas a presença de plug vaginal para confirmação de cópula, na manhã seguinte. Os embriões fertilizados foram coletados do oviduto 18 horas pós injeção de hCG utilizando um meio de cultivo KSOM tamponado com HEPES (FHM) (NAGY et al., 2003). Os zigotos tiveram as células do cumulus desnudadas por uso de solução contendo 0,3% de hialuronidase, lavados em FHM e cultivados sob óleo mineral em grupos de 20 embriões em gotas de 40 µl de KSOM (NAGY et al., 2003). Os embriões foram cultivados em incubadoras umidificadas em 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Os blastocistos foram obtidos após 96 horas de cultivo. Oócitos maduros foram coletados similarmente, porém sem que as fêmeas doadoras tenham sido pareadas com machos.

Após a obtenção dos embriões, realizamos a etapa de microcirurgia para produção de embriões heteroplásmicos. Para tal foi utilizado um microscópio invertido (Leica DMI RB; Leica, Wetzlar, Alemanha) equipado com micromanipuladores e

microinjetores (Narishige, Tóquio, Japão) baseado no protocolo de Ferreira et al. (FERREIRA et al., 2010), com algumas modificações. Resumidamente, zigotos em estágio de pró-núcleo foram colocados sob óleo mineral em gotas de 100 µl de FHM suplementados com 5 µg/ml de citocalasina B e 0,5 µg/ml de nocodazol (MEIRELLES; SMITH, 1997). Utilizando uma pipeta de vidro (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com 15 µm de diâmetro interno, uma biopsia citoplasmática de aproximadamente 30% do volume do embrião foi removida dos zigotos NZB e subsequentemente introduzida no espaço perivitelínico dos zigotos B6, do qual foi retirado previamente um volume citoplasmático semelhante. Posteriormente, esses zigotos manipulados foram transferidos para uma solução de eletrofusão (0,28 M Manitol, 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM HEPES e 0,05% BSA) e expostos a um único pulso elétrico de 1 kV/cm por 45 µs (Multiporator, Eppendorf). Como método alternativo, zigotos NZB e B6 foram incubados por 30 minutos em FHM suplementado com 5 µg/ml de citocalasina B e 0,5 µg/ml de nocodazol, antes da micromanipulação, e então foram centrifugados à 15,000 x g por 10 minutos. A centrifugação dos zigotos leva à formação de uma fração citoplasmática enriquecida com mitocôndrias (NAKAMURA et al., 1986; CRAN, 1987; TATHAM et al., 1996), possibilitando a geração de zigotos com maiores níveis de heteroplasma reconstruídos por transferência de citoplasma (FERREIRA et al., 2010). Assim, após a centrifugação, os zigotos foram submetidos ao procedimento de transferência de citoplasma como descrito acima, porém com o uso de uma fração citoplasmática enriquecida com mitocôndrias. Zigotos fundidos foram selecionados e cultivados até o estágio de blastocisto como já descrito. Parte dos zigotos reconstruídos foi transferida para o oviduto de fêmeas Swiss acasaladas com machos Swiss vasectomizados (NAGY et al., 2003). A anestesia dessas fêmeas receptoras foi realizada por injeção intra-peritoneal de 100 mg/kg de Ketamina (Dopalen, Ceva Santé Animale, Paulínia, Brasil) e 16 mg/kg de Xilazina (Rompun, Bayer, São Paulo, Brasil) (NAGY et al., 2003). As fêmeas fundadoras obtidas por estes procedimentos de transferência de citoplasma foram acasaladas com machos B6 para obter a primeira geração da progênie (chamada BC1). Posteriormente, a progênie fêmea de cada geração (BC1, BC2, BC3 e BC4) foi selecionada baseado no nível de heteroplasma e retrocruzada com machos B6. Esta linhagem de camundongos foi denominada B6/NZB. Essa etapa do projeto já foi publicada e mais detalhes podem ser encontrados no artigo em anexo (MACHADO et al., 2015).

## 6.2 NOCAUTE CONDICIONAL DOS GENES *Mfn1* E *Mfn2*

Nesta etapa do projeto, fêmeas representativas dos quatro grupos experimentais (WT, *Mfn1* cKO, *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO) foram obtidas via uma série de acasalamentos planejados ao longo dos quais os animais foram genotipados e selecionados no momento do desmame. Camundongos condicionais *MfnloxP* (CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007) foram obtidos dos Centros de Recursos Regionais de Camundongos Mutantes (RRID: MMRRC Cat # 029901-UCD, RRID: MMRRC\_029901-UCD e MMRRC Cat # 029902-UCD, RRID: MMRRC\_029902-UCD) enquanto camundongos transgênicos *Zp3-Cre* (DE VRIES et al., 2000) foram fornecidos pelo Laboratório Jackson (RRID: IMSR Cat # JAX: 003651, RRID: IMSR\_JAX: 003651). Para tal, fêmeas da linhagem heteroplásmica B6/NZB (MACHADO et al., 2015) foram acasaladas com machos *Zp3-Cre* (DE VRIES et al., 2000). Este transgene resulta na expressão de cre-recombinase, regulada pelo promotor do gene *Zp3*, exclusivamente nos oócitos em crescimento (a partir da fase de folículo primário/secundário). Subsequentemente, a progênie foi acasalada com machos *Mfn1* e/ou *Mfn2* floxed (CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; CHEN; CHAN, 2010), o que possibilitou a excisão de éxons dos genes *Mfn1* e/ou *Mfn2* nos oócitos. Abaixo resumimos as três principais etapas realizadas para obtenção deste modelo animal:

Etapa 1: Obtenção de animais da linhagem heretoplásmica B6/NZB com níveis de heteroplasmia estáveis. A estabilidade da linhagem foi mantida a metida que fizemos a quantificação de mtDNA NBZ dos animais, selecionando as fêmeas matrizes cada vez que necessário.

Etapa 2: Acasalamento de fêmeas heteroplásmicas com machos *Zp3-Cre*<sup>+/+</sup> por duas ou mais gerações. Estes acasalamentos resultaram em fêmeas com genótipo B6/NZB;*Zp3-Cre*<sup>+/+</sup>.

Etapa 3: As fêmeas obtidas na etapa anterior foram acasaladas com machos *Mfn1LoxP/LoxP* ou *Mfn2LoxP/LoxP*. As fêmeas da geração F1 (genótipos B6/NZB;*Zp3-Cre*<sup>+/-</sup>;*Mfn1*<sup>+/LoxP</sup> e/ou B6/NZB;*Zp3-Cre*<sup>+/-</sup>;*Mfn2*<sup>+/LoxP</sup>) foram acasaladas por uma ou mais gerações com machos F1 descendentes do mesmo

acasalamento ou do acasalamento paralelo (genótipos Zp3-Cre+/-;Mfn1+/LoxP e/ou Zp3-Cre+/-;Mfn2+/LoxP). As fêmeas obtidas nesses acasalamentos apresentaram os seguintes genótipos: B6/NZB;Zp3-Cre+/-;Mfn1+/+;Mfn2+/+(WT), B6/NZB;Zp3-Cre+/-;Mfn1LoxP/-;Mfn2+/+(Mfn1 cKO), B6/NZB;Zp3-Cre+/-;Mfn1+/+;Mfn2LoxP/-(Mfn2 cKO) e B6/NZB;Zp3-Cre+/-;Mfn1LoxP/-;Mfn2LoxP/-(Mfn1&2 cKO).

### 6.3 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os camundongos, mencionados acima, foram mantidos de acordo com as normas e procedimentos determinados e utilizados na instituição na qual foram instalados, como previamente aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), pela Comissão de Ética (CEUA) da UFSCar e da USP. Foi mantido, no biotério, um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, em uma temperatura de 25°C (NAGY et al., 2003). Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e a ração (Presence Ratos e Camundongos, Purina).

### 6.4 GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS

No momento do desmame (entre 21 e 25 dias pós nascimento) os animais tiveram seu genótipo determinado a partir do DNA total isolado de biópsia da orelha, segundo o procedimento elaborado em nosso laboratório (MACHADO et al., 2015). Para tal, a orelha foi furada utilizando-se um *ear punch* apropriado, o que resultou na coleta de um pedaço circular de tecido com cerca de 2 mm de diâmetro. Este tecido foi incubado com 200 µl de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/ml proteinase K] por 3 horas a 55°C. Ao término dessa etapa, o tecido foi incubado por 10 minutos a 95°C para inativação da proteinase K e armazenadas a -20°C até o uso, sendo submetido à amplificação por PCR e qPCR (MACHADO *et al.*, 2015). Para tal, as amostras foram diluídas em água ultrapura (Life Technologies) em uma proporção 1:5 para a genotipagem do *Mfn1* e/ou *Mfn2* e 1:500 para o transgene Zp3-Cre. Assim,

primers foram utilizados para a análise qualitativa da presença da sequência Loxp (forward: GAAGTAGGCAGTCTCCATCG; reverse: AACATCGCTCAGCCTGAACC), de exons excisados (forward: TGTTGGCAAGAAGCAGGACA, reverse: AGAAGAGCATGTGTGCTCCC) e do o transgene Zp3-Cre (forward: GCGGTCCAGTAAAACTATC, reverse: GTCAAACATTGTTGTCACCTT). A genotipagem do *Mfn1* e *Mfn2* (forma selvagem, LoxP e excisado) foi realizada por PCR convencional como descrito por estudos já realizados (CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; ISHIHARA et al., 2009; CHEN; CHAN, 2010). Para confirmação da presença do inserto transgênico Zp3-Cre os animais foram genotipados como sugerido pela The Jackson Laboratory, por PCR em tempo real (q-PCR) segundo protocolos já estipulados (DE VRIES et al., 2000). Já o nível de mtDNA NZB foi determinado de acordo com protocolo elaborado no laboratório (Machado et al., 2015), descrito abaixo.

Em suma, para a genotipagem das mitofusinas foram utilizados 400 ng de primer e o reagente para PCR JumpStart (Sigma-Aldrich) segundo as recomendações do fabricante. Para a fase de iniciação da q-PCR, as amostras passaram por um ciclo a 94°C durante 2 minutos, e para a desnaturação das fitas de DNA a temperatura utilizada foi de 94°C por 30 segundos, seguida do anelamento dos primers a 65°C durante 30 segundos. Já a fase alongação foi realizada a 72°C durante 1 minuto e 3 segundos. Todas as três fases - desnaturação, anelamento e alongamento - ocorreram em uma repetição de 30 ciclos seguidos. No momento da fase de alongamento final, as amostras foram submetidas a um ciclo de 5 minutos a 72°C. Finalmente, a PCR foi encerrada a 4°C. No término da PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% em TBE (tampão Tris/Borato/EDTA) contendo SYBR Safe (Life Technologies) na proporção de 1:10.000.

No caso da genotipagem do transgene Zp3-Cre, foram utilizados 200 ng de primer com o reagente para PCR Power SYBR Green Master Mix (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante, no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies). Os parâmetros da ciclagem para este foram segundo protocolo também padronizado em nosso laboratório (Macabelli et al., 2014). A fluorescência do SYBR Green foi então, a cada passo, mensurada a uma temperatura de 62°C. Cada amostra foi amplificada em duplicata. A análise da presença ou ausência do transgene Zp3-Cre foi conduzida utilizando o software 7500

Software (v. 2.0.6; Life Technologies).

## 6.5 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO A TERMO

As fêmeas de interesse, com 8 a 51 semanas de idade, foram acasaladas com machos férteis WT e verificadas quanto a presença de plug vaginal diariamente. Uma vez verificada a presença do plug vaginal, as mesmas foram alojadas em gaiolas individuais e acompanhadas em seu tempo de gestação. Havendo nascimento, a progênie foi avaliada quanto ao número de animais nascidos e desmamados (após 23 dias), curva de crescimento e nível de mtDNA NZB. Para análise da curva de crescimento, os animais foram pesados semanalmente por cinco semanas, iniciando-se no momento do desmame. O nível de mtDNA NZB foi determinado ao desmame (com base em biópsia de orelha) e aos 100 dias de vida. Neste último caso, cauda, fígado e baço foram coletados após eutanásia dos animais.

## 6.6 ISOLAMENTO DE OÓCITOS

Fêmeas com 5 semanas de idade foram superovuladas por injeção intraperitoneal de 5 U.I de eCG e 5 U.I de hCG com intervalo entre as injeções de 47 horas, como já descrito (NAGY et al., 2003). Após 12h da aplicação de hCG, os oócitos foram recuperados por rompimento do oviduto em meio FHM (NAGY et al., 2003), com auxílio de uma agulha 30G, e desnudados das células do cumulus por pipetagem na presença de 0,3% de hialuronidase. Os oócitos foram classificados em viáveis e inviáveis quanto às suas características morfológicas, selecionando somente oócitos íntegros, não degenerados, e também inspecionados quanto a presença do primeiro corpúsculo polar. Esses foram então lavados em solução de PBS + 0,01% de BSA e fixados com o menor volume possível da mesma solução, em tubos de 0,2 ml até seu uso, sendo mantidos em um freezer -80°C.

No caso da obtenção de oócitos imaturos, esses foram coletados de 42 a 44

horas após a injeção de eCG. Para tal, após a eutanásia do animal, seus ovários coletados para dissecação com auxílio de uma agulha de 30G em solução fisiológica. Em seguida, os oócitos foram transferidos para o meio de FHM e os complexos cumulus oócitos (COCs) foram obtidos por meio do rompimento dos folículos antrais, ainda com auxílio da agulha de 30G (NAGY et al., 2003). Posteriormente, os oócitos foram desnudados das células do cumulus por pipetagem. Esta etapa foi realizada com auxílio de um capilar de vidro com diâmetro interno de ~80 µm, sendo próximo ao diâmetro dos oócitos (NAGY et al., 2003), e então lavados em solução tampão fosfatada (PBS) + 0,01% de BSA (BSA; Sigma-Aldrich). Os oócitos foram avaliados quanto a morfologia e somente os íntegros, sem células do cumulus e em estágio de vesícula germinativa (GV) foram selecionados e utilizados nas análises seguintes.

Os oócitos obtidos acima foram utilizados para determinação do diâmetro oocitário bem como do nível de mtDNA NZB, número de cópias de mtDNA e distribuição mitocondrial.

## 6.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MTDNA NZB EM OÓCITOS E OUTROS TECIDOS

Para análise do mtDNA em oócitos, estes foram digeridos como descrito previamente. O mesmo procedimento, descrito acima para determinação do mtDNA em biópsia de orelha, foi seguido. Já no caso de outros tecidos (cauda, baço e fígado), estes tiveram seu DNA total extraído por uso de 25 fenol: 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico (CREE et al., 2008). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, EUA) e diluído em água ultrapura à concentração de 5 e 0,5 ng/µl para uso nas reações de qPCR. O cálculo da heteroplasmia foi realizado seguindo a metodologia desenvolvida no laboratório (MACHADO et al., 2015). De forma resumida, tal medição foi feita por amplificação em paralelo da quantidade de mtDNA NZB e B6, em reações independentes de qPCR, tendo sido fundamentada na tecnologia de ARMS (NEWTON et al., 1989; STEINBORN et al., 2000; BIFFI et al., 2011; WANG et al., 2011; LEE et al., 2012; BURGSTALLER et al., 2014). As sequências de NZB e B6 encontram-se disponíveis

no Genbank, sendo (L07095.1) (LOVELAND et al., 1990) e (NC\_005089.1), respectivamente (BAYONA-BAFALUY et al., 2003). Os primers ARMS22 e MT20 amplificam um fragmento de 118 bp, compreendendo os nucleotídeos de 3.578 a 3.695 do mtDNA NZB (parte do gene mt-Nd1); já os primers ARMS2 e MT14 amplificam 146 bp, compreendendo o intervalo de 3.815 a 3.960 do mtDNA B6 (parte dos genes mt-Tq , mt-Tm e mt-Nd2) (Tabela 1). As reações de qPCR continham 15 µl, sendo: 200 nM de cada primer (ARMS22 e MT20 ou ARMS2 e MT14), 7,5 µl de 1x Power SYBR Green Master Mix (Life Technologies) e 5 µl de DNA. As amplificações foram realizadas com o 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 1 minuto. As amostras foram analisadas em duplicatas ou triplicatas para o cálculo da heteroplasmia, assim como já desenvolvido por Machado e colaboradores (MACHADO *et al.*, 2015).

Tabela 1. Sequencia de primers utilizados para cálculo da heteroplasmia e número de cópias de mtDNA.

Alvo	Primer	Sequencia (5'-3') <sup>a</sup>	Produto (bp)
mtDNA <sup>b</sup>	MT12	CGCCCTAACAACTATTATCTTCC	736
	MT13	GACCGTTTGTGGTTGTTGAAA	
mtDNA <sup>b</sup>	MT14	CTCCGTGCTACCTAACACCTTATC	148
	MT15	GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG	
B6 mtDNA <sup>c</sup>	MT14	CTCCGTGCTACCTAACACCTTATC	146
	ARMS2	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGtC	
NZB mtDNA <sup>d</sup>	MT20	TGGCACTCCCGCTGTAAAAA	118
	ARMS22	TTATCCACGCTTCCGTTACGtC	
Apob (nuclear DNA)	OIMR1544	CACGTGGGCTCCAGCATT	74
	OIMR3580	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG	

Legenda: <sup>a</sup> Nucleotídeos sublinhados são complementares a um dos haplótipos de mtDNA (NZB ou B6) devido à presença de um nucleotídeo polimórfico na posição 3.599 (ARMS22) e 3.932 (ARMS2), respectivamente. Um nucleotídeo incompatível introduzido imediatamente 5' nos sítios polimórficos é representado em minúsculas.

<sup>b</sup> Ensaios não-discriminativos que amplificam o mtDNA de origem B6 e NZB.

<sup>c</sup> Ensaio Discriminativo que amplifica o mtDNA de origem

<sup>d</sup> Ensaio Discriminativo que amplifica o mtDNA de origem NZB.



## 6.8 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA EM OÓCITOS

Esta análise foi realizada como descrito previamente (Machado et al., 2015). Utilizando os primers MT12 e MT13 (Tabela 1), um fragmento de 736 pb abrangendo os nucleotídeos 3,455 a 4,190 de ambos os mtDNAs B6 e NZB foi amplificado e clonado num pCR2.1-TopoTA (Life Technologies). Assim, baseado na espectroscopia de UV, o DNA de plasmídeo resultante (pDNA) foi aliquotado em uma concentração de  $0,2 \times 10^9$  cópias/ $\mu$ l e mantido a  $-80^\circ\text{C}$  até sua utilização. Para quantificação do número de cópias de mtDNA foi preparada uma curva padrão por diluição do pDNA para  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  cópias por reação. Esta curva padrão foi amplificada em paralelo com amostras contendo 10% de lisado de embrião (5  $\mu$ l de um total de 50  $\mu$ l de lisado). Então, a amplificação foi feita como descrito para a quantificação da heteroplasmia, porém com a utilização dos primers MT14 e MT15. Tais primers não são discriminativos, amplificando um fragmento de 148 bp, compreendendo o intervalo de 3.815 a 3.962 do mtDNA NZB assim como do mtDNA B6 (parte dos genes *mt-Tq*, *mt-Tm* e *mt-Nd2*). Baseado nos valores da curva-padrão amplificada em paralelo, foi estimado o número de cópias de cada amostra utilizando o Software 7500 (v. 2.0.6; Life Technologies).

Com relação ao número de cópias de mtDNA por célula em tecidos somáticos; este foi realizado pela normalização da quantidade de mtDNA contra um gene nuclear de cópia única (Apob) (NICKLAS et al., 2004). Os primers MT14 e MT15 foram usados para amplificar o mtDNA, enquanto os primers OIMR1544 e OIMR3580 foram usados para amplificar um fragmento de 74 pb do gene Apob (Tabela 1). Ambas as reações foram realizadas em paralelo e seguindo as condições de amplificação descritas acima. O número de cópias de mtDNA por célula foi então determinado como relatado por Nicklas et al. (NICKLAS et al., 2004).

## 6.9 ANÁLISE DOS DADOS

No mínimo 15 amostras, provenientes de três experimentos independentes, foram consideradas por estágio e grupo experimental para cada uma das análises propostas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS

System v. 9.3 e nível máximo de significância igual a 5% (erro  $\alpha$ ). Foi sempre testado se os dados de uma determinada análise seguem as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variância, caso contrário os dados foram transformados (raiz quadrada ou log) ou utilizado um teste não paramétrico. O número de filhotes por fêmea, o número de oócitos ovulados e o diâmetro oocitário foram comparados entre os grupos experimentais por análise de variância (PROC GLIMMIX) seguido do teste post-hoc de Duncan. O crescimento da progênie foi comparado entre os grupos experimentais como medidas repetidas no tempo por análise de variância (PROC MIXED) e comparação de médias por Tukey. Para análise do nível de mtDNA NZB foi considerado o delta NZB, calculado a partir da diferença do nível de mtDNA NZB entre o oócito ou a progênie e a respectiva fêmea doadora de oócito (SHARPLEY et al., 2012b). O delta NZB e a quantidade de mtDNA foram analisadas considerando um delineamento fatorial (estágio do desenvolvimento do oócito versus grupo experimental) por análise de variância (PROC GLIMMIX) e comparação de médias por Tukey. O delta NZB na progênie foi comparado entre os grupos experimentais por análise de variância (PROC GLIMMIX) seguido do teste post-hoc de Tukey.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 EXPERIMENTO 1: QUANTIFICAÇÃO DA HETEROPLASMIA NA LINHAGEM B6/NZB

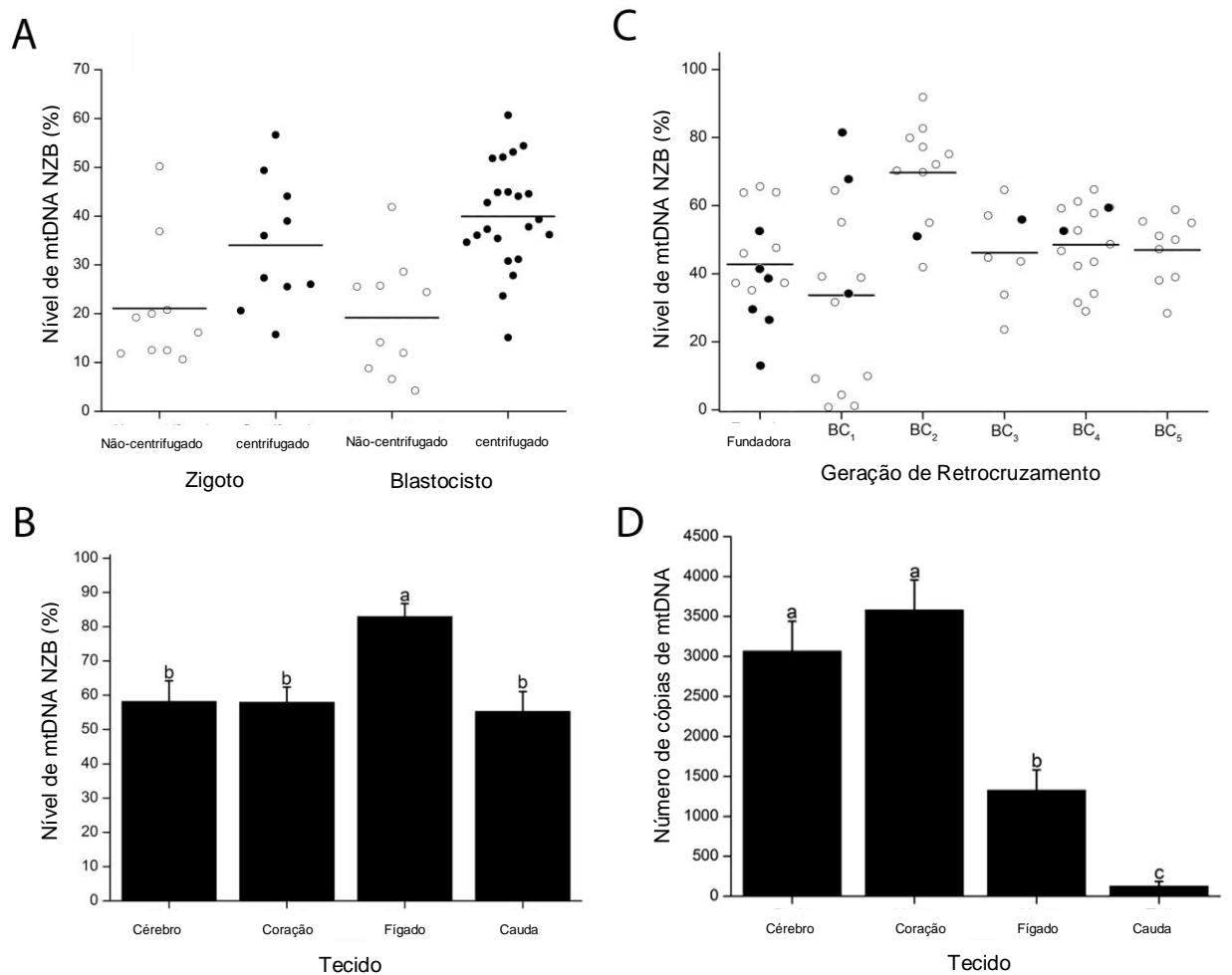
Primeiramente, comparamos o nível de mtDNA NZB em embriões produzidos por dois métodos baseados em transferência de citoplasma (Figura 10A). Segundo nossas mensurações, zigotos do grupo centrifugado continham  $34,0\% \pm 3,76$  (variação, 15,7–56,6) de mtDNA NZB em comparação a  $21,1\% \pm 3,76$  (variação, 10,7–50,2) presente em zigotos do grupo não centrifugado (Figura 10A). Os embriões cultivados até blastocisto confirmaram esses resultados (Figura 10A), pois continham  $39,9\% \pm 2,54$  (variação, 15,1–60,7) de mtDNA NZB no grupo centrifugado enquanto que os blastocistos do grupo não centrifugado continham  $19,2\% \pm 3,76$  (variação, 4,3–41,9). Logo, consistente com nossos resultados anteriores (FERREIRA et al., 2010), embriões do grupo centrifugado continham, independentemente do estágio de desenvolvimento ( $P < 0,0001$ ), maior nível de mtDNA NZB do que o grupo não centrifugado.

Baseado nesses resultados, embriões do grupo centrifugado foram transferidos para receptoras resultando no nascimento de 14 filhotes (Figura 10C). Esses camundongos fundadores continham em média  $42,8\% \pm 3,92$  (variação, 13,0–65,6) de mtDNA NZB na cauda, o que não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos níveis encontrados nos zigotos do mesmo grupo experimental (Figura 10A). Contudo, o nível de mtDNA NZB nos fundadores diferiu na cauda ( $P < 0,05$ ) entre machos ( $49,6\% \pm 4,72$ ) e fêmeas ( $33,7\% \pm 5,45$ ). Além disso, análises de cinco machos heteroplásmicos envelhecidos até quatro meses de idade evidenciaram que o nível de mtDNA NZB varia entre os tecidos (Figura 10B). Esses machos continham mais mtDNA NZB ( $P = 0,004$ ) no fígado ( $83,0\% \pm 5,08$ ) que na cauda ( $55,3\% \pm 5,08$ ), coração ( $58,0\% \pm 5,08$ ) ou cérebro ( $58,2\% \pm 5,08$ ), o que está de acordo com outros estudos (JENUTH; PETERSON; SHOUBRIDGE, 1997; BATTERSBY; LOREDO-OSTI; SHOUBRIDGE, 2003; SHARPLEY et al., 2012a; BURGSTALLER et al., 2014).

Com base nesses resultados, foram selecionadas seis fêmeas heteroplásmicas para serem as fundadoras da linhagem B6/NZB. Essas fêmeas foram acasaladas com machos B6 o que resultou no nascimento de 13 fêmeas (Figura 10C). O nível de mtDNA NZB presente na cauda das fêmeas da primeira geração de retrocruzamentos (B1) foi igual a  $33,7\% \pm 7,32$ , portanto, idêntico ao valor médio verificado para as fêmeas fundadoras (Figura 10C). Por outro lado, o nível de mtDNA NZB nas fêmeas BC<sub>1</sub> variou muito mais (0,8% a 81,3% e CV igual a 78,4%) do que nas fêmeas fundadoras (13,0% a 52,8% e CV igual a 37,3%), resultando em alguns animais praticamente homoplásmicos (Figura 10C). Para estabelecer uma linha heteroplásmica, três fêmeas da geração BC<sub>1</sub> (com 34,2%, 67,8% e 81,3% de mtDNA NZB) foram retrocruzadas por quatro gerações. Isso resultou e fêmeas das gerações BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub> e BC<sub>5</sub> com  $69,7\% \pm 4,45$  (variando de 41,9% a 91,9%),  $46,2 \pm 5,00$  (variando de 23,6 a 64,6),  $48,5\% \pm 3,18$  (variando de 29,0 a 64,7) e  $47,0\% \pm 3,12$  (variando de 28,4 a 58,7) de mtDNA NZB, respectivamente. Três fêmeas da geração BC<sub>4</sub> contendo 31,5%, 46,7% e 59,2% de mtDNA NZB também tiveram a heteroplasmia mensurada nos seus oócitos, os quais continham, respectivamente,  $22,4\% \pm 2,33$  (variando de 7,9 a 32,9),  $41,9\% \pm 3,59$  (variando de 23,3 a 53,5) e  $48,2\% \pm 7,28$  (variando de 21,7%  $\pm$  2,33) de mtDNA NZB.

Utilizando cinco machos heteroplásmicos descritos acima encontramos que o número de cópias de mtDNA (Figura 10D) é maior ( $P < 0.0001$ ) no cérebro ( $3.066,4 \pm 373,58$ ; 2.335,0 – 4469,4) e coração ( $3.579,9 \pm 375,55$ ; 2470,5 – 4804,9) que no fígado ( $1.326,8 \pm 255,53$ ; 660,9 – 2.236,8) e cauda ( $126,8 \pm 58,14$ ; 24,5 – 225,8). A Análise de oócitos heteroplásmicos de três fêmeas BC<sub>4</sub> indicaram que esses continham  $344.738 \pm 11.981$  (variação 179.185 – 477.175) cópias de mtDNA.

Figura 10 - Geração e quantificação da heteroplasmia da linhagem heteroplásmica B6/NZB



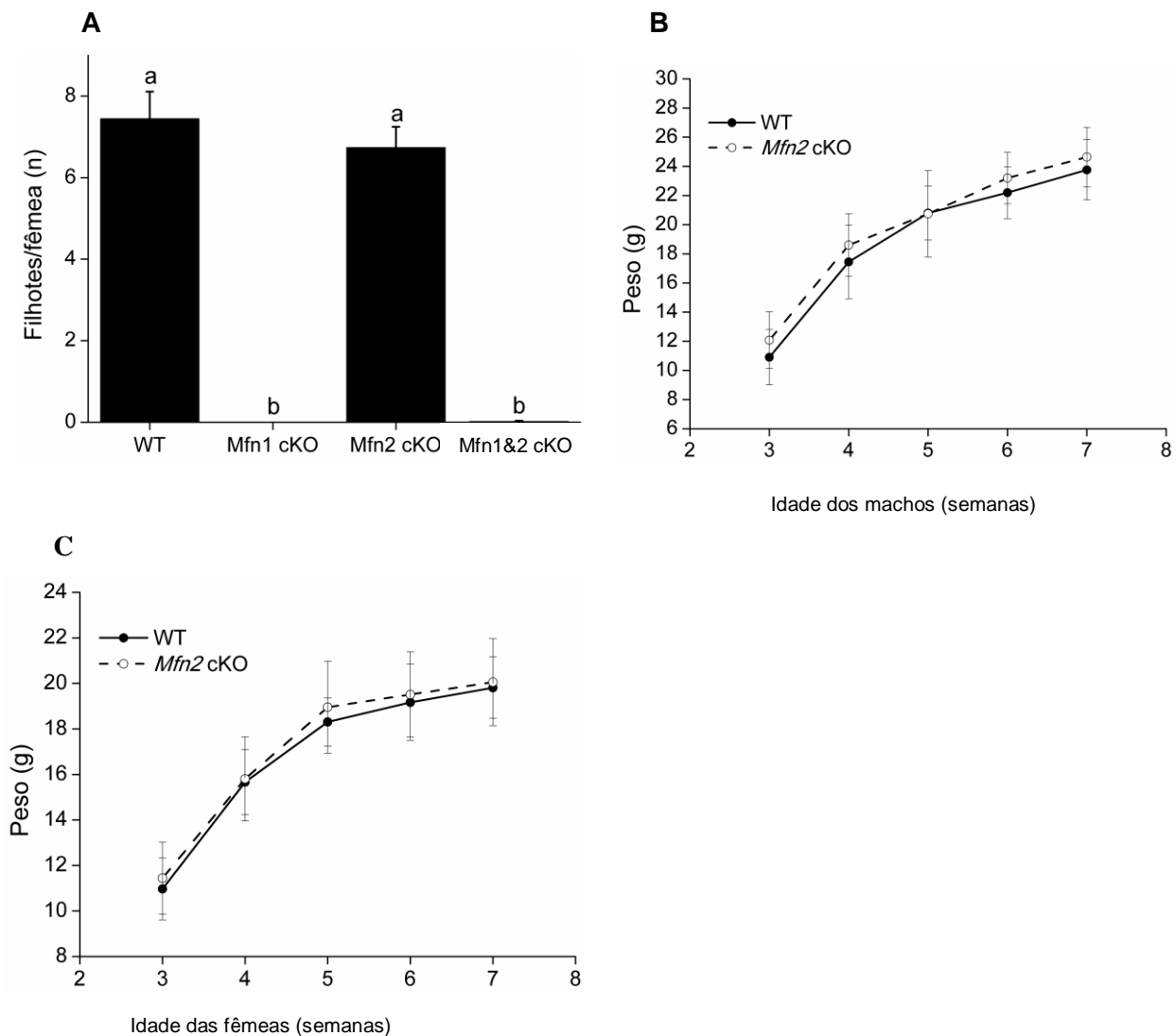
Legenda: (A) Nível de mtDNA NZB em zigotos e blastocistos centrifugados e não centrifugados. (B) Nível de mtDNA NZB em diferentes tecidos provenientes de machos heteroplásmicos de quatro meses de idade. (C) Nível de mtDNA NZB da cauda de fêmeas fundadoras e de mais cinco grupos de fêmeas em subseqüentes retrocruzamentos. (D) Quantidade de mtDNA em diferentes tecidos provenientes de machos heteroplásmicos de quatro meses de idade.

## 7.2 EXPERIMENTO 2: O *Mfn1* É ESSENCIAL PARA O CRESCIMENTO DO OÓCITO

Tendo desenvolvido a linhagem heteroplásmica B6/NZB, nosso próximo objetivo foi investigar o efeito da fusão mitocondrial (mitofusinas) sobre a oogênese e a herança mitocondrial. Para tal, observarmos primeiramente a capacidade das fêmeas com oito semanas de idade, portadoras de oócitos dos diferentes grupos

experimentais (WT, *Mfn1* cKO, *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO), suportarem o desenvolvimento a termo quando acasaladas, durante 40 semanas, com machos WT sabidamente férteis. O acasalamento foi comprovado pela presença de tampão vaginal (plug). Quando somente um alelo foi nocauteado, seja do *Mfn1* ou *Mfn2*, não houve qualquer diferença quanto a fertilidade, como esperado (CHEN et al., 2003), de forma que os filhotes nasceram seguindo a frequência Mendeliana (DE VRIES et al., 2000). No entanto, com o nocaute de ambos alelos, observou-se que as fêmeas do grupo *Mfn1* cKO não produziram descendentes em nenhuma das vezes em que foram copuladas (Figura 11A). Por outro lado, o nocaute do *Mfn2* não afetou o número de animais nascidos, nem o ganho de peso em comparação com o grupo WT (Figura 11A, B e C). Tal resultado sugere que o nocaute de *Mfn2* não afeta a competência do desenvolvimento oocitário. Finalmente, o duplo nocaute do *Mfn1* e do *Mfn2* resultou em somente um nascimento contendo um único filhote (Figura 11A).

Figura 11 - Número de animais nascidos e curva de ganho de peso da progênie



Legenda: (A) Acasalamento de fêmeas com >8 semanas de idade com machos férteis. É apresentado o número de animais nascidos por fêmea copulada. O grupo Mfn2 cKO apresentou comportamento semelhante ao grupo controle. Já os grupos Mfn1 cKO e Mfn1&2 cKO se mostraram inférteis. Grupos indicados por letras diferentes sobre as barras diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

(B-C) Curva de ganho de peso de machos (B) e fêmeas (C) derivados de oócitos Mfn2 cKO e WT. Não foi observada diferença entre os grupos.

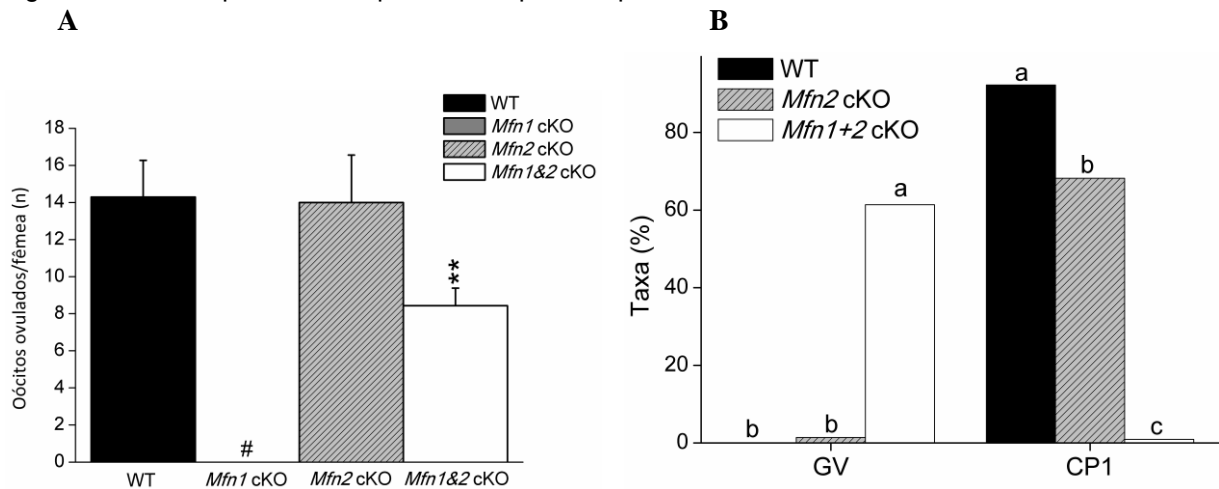
Esses resultados permitem concluir que o *Mfn1* desempenha função essencial na determinação da competência de desenvolvimento do oócito, a qual independe do efeito do *Mfn2*. De fato, em experimentos com cultura celular o *Mfn1* provou ser mais eficiente do que o *Mfn2* em manter a fusão e a atividade mitocondrial (ISHIHARA; EURA; MIHARA, 2004; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; SCHREPFER; SCORRANO,



2016). Além disso, o *Mfn1*, mas não o *Mfn2*, interage com a *Opa1* para promover a fusão da membrana mitocondrial interna (CIPOLAT et al., 2004). No entanto, esses resultados contrastam com os de Chen et al. (CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007) que descreveram que fêmeas *Mfn1*<sup>-/-</sup>, as quais não expressam o *Mfn1* em nenhum dos seus tecidos, são completamente férteis. Apesar disso, Wai et al. (WAI et al., 2010) também verificaram uma divergência similar ao compararem a fertilidade de fêmeas *Tfam*<sup>+/-</sup> com a daquelas que tiveram o *Tfam*<sup>+loxP</sup> nocauteado por uso da linhagem Zp3-Cre. Os autores observaram que o nocaute mediado por Zp3-Cre resulta em severa infertilidade e oócitos com ~18.000 cópias de mtDNA, enquanto que fêmeas *Tfam*<sup>+/-</sup> são férteis e contêm oócitos com ~69.000 cópias de mtDNA (WAI et al., 2010). Portanto, uma vez que as fêmeas *Mfn1*<sup>-/-</sup> são viáveis, apesar de não expressarem o *Mfn1*, é plausível considerar que uma resposta adaptativa seja responsável por preservar, entre outras funções, a fertilidade.

Para elucidar a infertilidade dos grupos *Mfn1* cKO e *Mfn1&2* cKO, fêmeas dos grupos experimentais com cinco semanas foram superovuladas para recuperação de seus oócitos (Figura 12A). Não foi obtido nenhum oócito do grupo *Mfn1* cKO, confirmando o achado do experimento anterior. Surpreendentemente, o grupo *Mfn1&2* cKO obteve uma recuperação de  $8,4 \pm 0,95$  oócitos/fêmea (Figura 12A), enquanto que os grupos WT e *Mfn2* cKO tiveram uma recuperação de  $14,3 \pm 1,98$  e  $14,0 \pm 2,56$ , respectivamente (Figura 12A). Esses dados sugerem que a infertilidade observada no grupo *Mfn1&2* cKO não foi causada por um defeito na ovulação, mas sim na maturação ou no desenvolvimento pós-fecundação (LIU et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Uma vez que 96,9% dos oócitos *Mfn1&2* cKO não apresentavam o primeiro corpúsculo polar (comparado com 8% e 52,6% nos oócitos WT e *Mfn2* cKO) (Figura 12B) e 61,4% desses apresentavam-se em estágio de vesícula germinativa (GV) (comparado com 0% e 4,2% nos oócitos WT e *Mfn2* cKO), é bastante provável que a incapacidade de maturação desses oócitos foi o fator causador de infertilidade. Dando maior amparo a tal achado, fêmeas *Mfn1&2* cKO, quando superovuladas e acasaladas com machos WT, tiveram somente oócitos não fertilizados recuperados, evidenciando a inviabilidade oocitária.

Figura 12 - Quantidade de oócitos viáveis ovulados e porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa ou apresentando primeiro corpúsculo polar



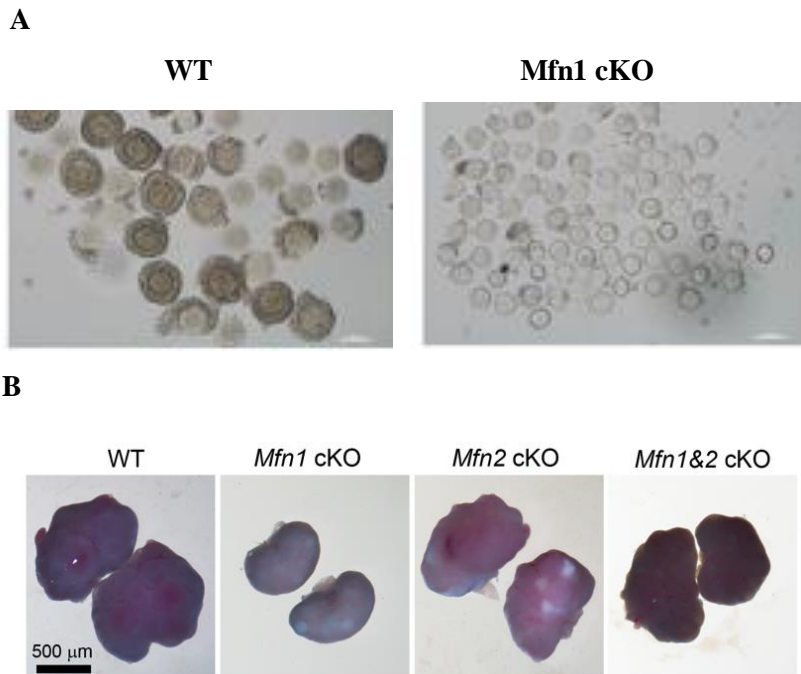
Legenda; (A) Fêmeas com 5 semanas de idade foram superovuladas com eCG e hCG. É apresentado o número de oócitos viáveis (ovulados) e não viáveis obtido por fêmea a partir do oviduto. Nota-se que o grupo *Mfn1* cKO não teve capacidade de ovular, enquanto o grupo duplo nocaute se apresentou em uma condição intermediária, indicando possível dificuldade na maturação oocitária e não na ovulação. O grupo *Mfn2* cKO se comportou como o grupo controle, sem alteração. Grupos indicados por letras diferentes sobre as barras diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

(B) Taxa do primeiro corpúsculo polar e de oócitos em vesícula germinativa em cada grupo experimental. Tal resultado reafirma a inviabilidade de maturação oocitária do grupo *Mfn1&2* cKO, uma vez que os muitos oócitos desse grupo se apresentaram em estágio de GV e quase nenhum apresentando o primeiro corpúsculo polar.

Uma vez que os oócitos do grupo *Mfn1* cKO não foram capazes de ovular, é surpreendente que oócitos *Mfn1&2* cKO tenham sido ovulados. Isto porque acreditava-se que a perda de ambos genes apresentaria maior gravidade funcional do que a perda de um único gene, devido às funções distintas e redundantes de cada mitofusina (CHEN et al., 2003, 2010; ISHIHARA; EURA; MIHARA, 2004; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; CHEN; LIU; DORN, 2011). De maneira a confirmar nossos achados, estimulamos com eCG fêmeas de cinco semanas para obtenção de oócitos imaturos plenamente crescidos, esperando verificar um resultado semelhante ao do grupo controle, tendo os oócitos circundados por diversas células, as células do cumulus, e diâmetro de  $85.7 \pm 0.49 \mu\text{m}$  como no grupo controle (Figura 13A). Contudo, o grupo *Mfn1* cKO apresentou seu tamanho significativamente menor,  $57.8 \pm 0.73 \mu\text{m}$  (Figura 13A), e os outros grupos *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO apresentaram tamanho igual ou ligeiramente reduzido, quando comparado ao grupo controle. Ademais, fêmeas *Mfn1* cKO apresentaram ovários visivelmente menores (Figura 13B) que continham oócitos destituídos de células do

cumulus (Figura 13A). Tal característica não foi constatada nos demais grupos.

Figura 13 - Oócitos imaturos dos grupos WT e *Mfn1* cKO e ovários de todos os grupos

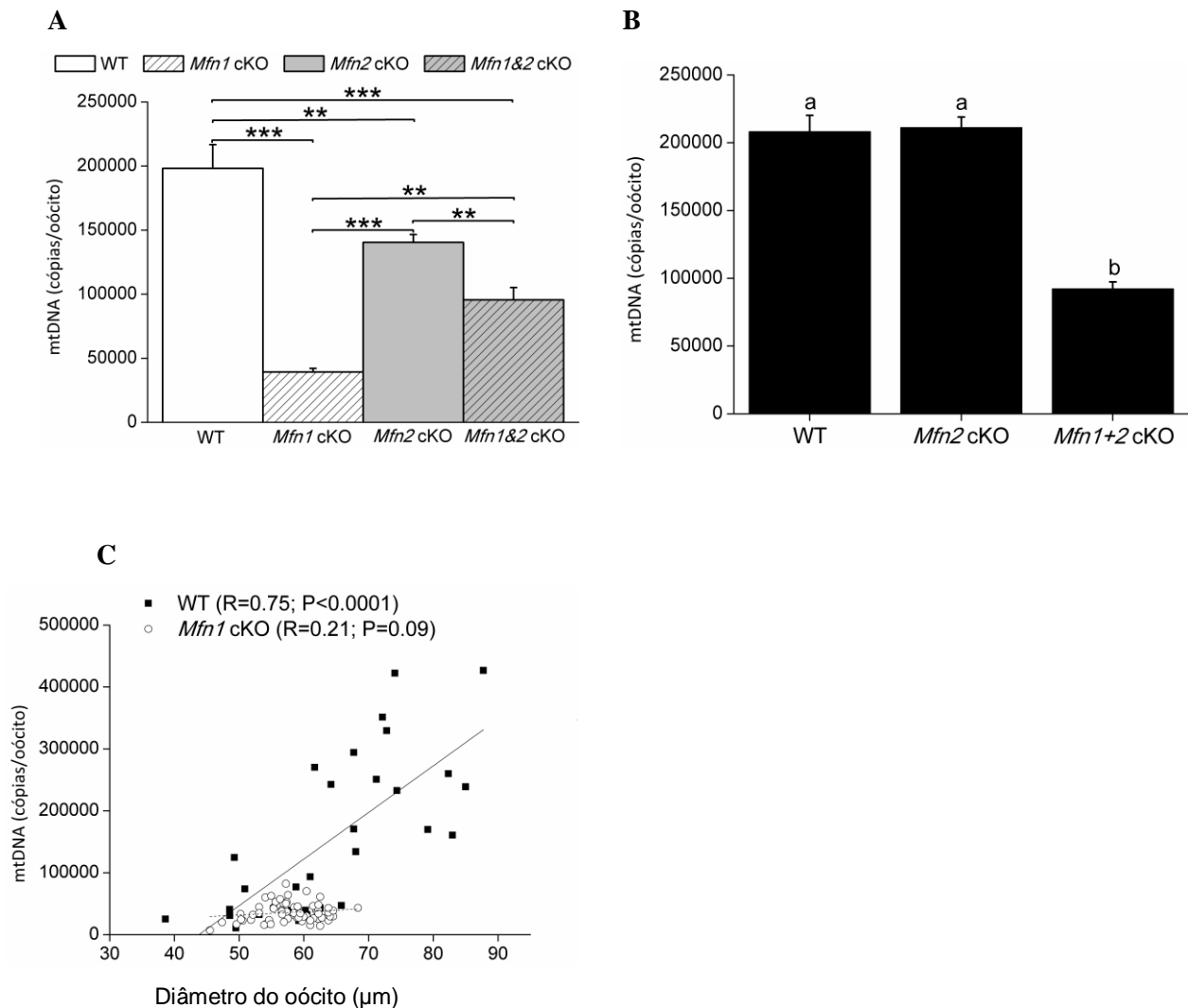


Legenda: (A) Oócitos imaturos obtidos de fêmeas com 5 semanas de idade estimuladas com eCG. Comparado com os oócitos *Mfn1* cKO, os oócitos WT são maiores e circundados por várias camadas de células do cumulus.  
(B) Ovários de animais com 5 semanas de idade dos quatro grupos experimentais. Os ovários do grupo *Mfn1* cKO são visivelmente menores, comparado aos outros grupos.

Em camundongos já foi visto que o duplo nocaute do *Mfn1* e do *Mfn2* no músculo esquelético interferiu no acúmulo de mtDNA durante o desenvolvimento do tecido, resultando em baixíssimos níveis de mtDNA (CHEN et al., 2010). Assim, o número de cópias de mtDNA foi analisado; com relação ao controle, notou-se que os oócitos *Mfn1* cKO, *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO apresentaram, respectivamente, ~20%, ~100% e ~50% do número de cópias de mtDNA, reforçando o quadro de deficiência de crescimento e desenvolvimento adequados (Figura 14A). Também foi observado que o conteúdo de mtDNA, em oócitos *Mfn2* cKO, foi restabelecido com a ovulação (Figura 14B). Deste modo pode-se afirmar que o nocaute de *Mfn1* impediu o acúmulo de mtDNA, levando a um bloqueio no desenvolvimento, enquanto o nocaute duplo de *Mfn1* e *Mfn2* levou a um resgate de cópias de mtDNA, aumentando para níveis intermediários. Considerando que *Mfn1* cKO impactou no crescimento do oócito, corrigimos a quantidade de mtDNA nos oócitos GV pelo volume do gameta (Figura

14C). Essa correção é apoiada por distintos relatórios mostrando que esses dois eventos estão intimamente ligados (CAO et al., 2007; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008; MAHROUS; YANG; CLARKE, 2012). Desta forma, descobrimos que oócitos Mfn1 cKO e Mfn1&2 cKO continham 65% e 67%, respectivamente, da quantidade de mtDNA presente nos oócitos WT, comparados com 92% nos oócitos Mfn2 cKO. Tais resultados evidenciam que o maior nível de mtDNA em oócitos Mfn1&2 cKO, em comparação com oócitos Mfn1 cKO, ressalta a competência de crescimento desses oócitos em comparação com os do grupo Mfn1 cKO.

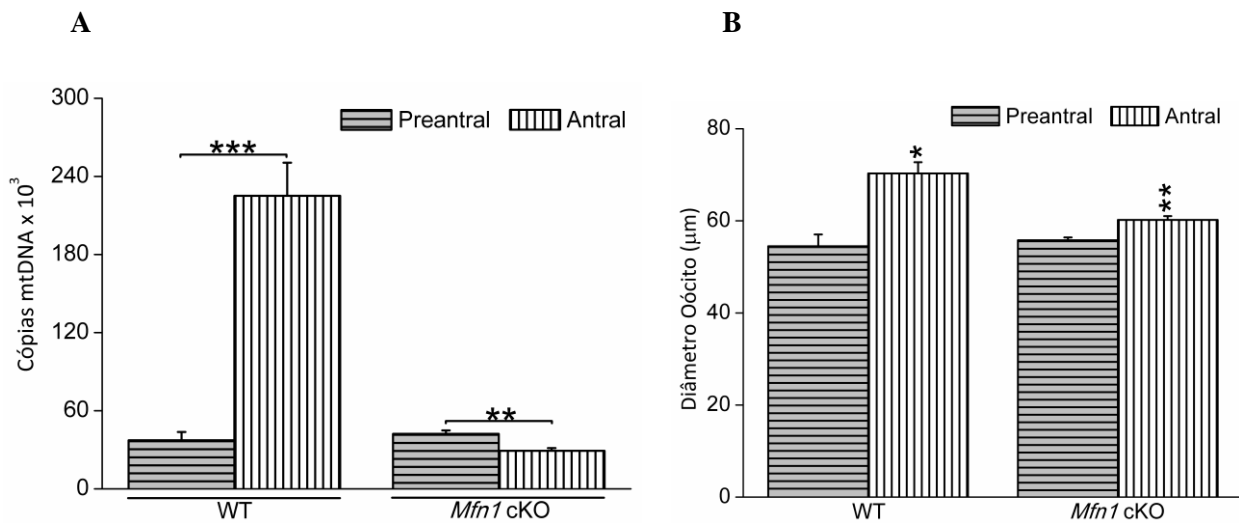
Figura 14 - Estudo de cópias de DNA mitocondrial



Legenda: (A) Número de cópias de mtDNA de oócitos imaturos, evidenciando alta deficiência de todos os, comparado com o controle. Uma pior condição é observada no grupo *Mfn1* cKO e condição intermediária do duplo nocaute, indicando um resgate parcial do número de cópias.  
 (B) Número de cópias de mtDNA de oócitos ovulados, evidenciando uma recuperação do grupo *Mfn2* cKO pós ovulação.  
 (C) Correção da quantidade de mtDNA nos oócitos GV pelo volume do gameta, dos grupos WT e *Mfn1* cKO.

Ainda para aprofundar na interferência do *Mfn1* com o mtDNA, comparamos oócitos *Mfn1* cKO e WT coletados aos 12 e 32 dias. Oócitos de fêmeas de 32 dias de idade foram obtidos por punção de folículos antrais, enquanto em fêmeas de 12 dias de idade foram recuperados oócitos (presumivelmente de folículos secundários) após digestão enzimática dos ovários. Constatamos que enquanto o grupo controle tem um

aumento do número de cópias de mtDNA de pouco menos que 50.000 cópias para mais de 250.000, o grupo *Mfn1* cKO não chega nem a atingir 50.000 cópias (Figura 15A). Surpreendentemente, foi observado um leve crescimento do diâmetro oocitário do grupo *Mfn1* cKO, dos oócitos do dia 12 aos do dia 32 (Figura 15B). Tal crescimento corrobora com achados anteriores (CHEN et al., 2010) que identificaram uma associação disruptiva entre o acúmulo de mtDNA e o desenvolvimento de músculo esquelético deficiente para a fusão. Assim, células sem *Opa1* ou *Mfn1* e *Mfn2* perdem mtDNA mais prontamente devido à completa ausência de fusão (CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007; CHEN et al., 2010). Em comparação, células sem *Mfn1* ou *Mfn2* apresentam heterogeneidade nucleóide, mas não depleção de mtDNA (CHEN et al., 2003; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007). Em contraponto, em nosso estudo evidenciamos que o nocaute de *Mfn1* impediu o acúmulo de mtDNA, enquanto que o nocaute duplo de *Mfn1* e *Mfn2* permitiu o crescimento oocitário e, conseqüentemente, acúmulo de mtDNA. No entanto, utilizando um sistema de crescimento *in vitro* de oócitos, Mahrous et al. (MAHROUS; YANG; CLARKE, 2012) mostraram que o crescimento de oócitos e o acúmulo de mtDNA não estão mecanicamente acoplados. Levando em conta que os oócitos *Mfn1* cKO apresentaram crescimento discreto, isso sugere que o defeito no acúmulo de mtDNA precedeu, e até contribuiu, com sua parada de desenvolvimento descrita acima. Assim, argumentamos que o nocaute de *Mfn2* não apenas resgatou o crescimento, mas também o acúmulo de mtDNA em oócitos *Mfn1*&*2* cKO.

Figura 15 - Oócitos *Mfn1* cKO e WT coletados aos 12 e 32 dias

Legenda: (A) Número de cópias de mtDNA de oócitos antrais e preantrais, evidenciando a deficiência do *Mfn1* cKO de aumentar o número de cópias de mtDNA para adequado desenvolvimento oocitário.  
 (B) Diâmetro de oócitos antrais e preantrais, onde nota-se que o grupo *Mfn1* cKO também apresenta um pequeno aumento em seu tamanho.

Os resultados observados até então ressaltam a importância do *Mfn1* nos oócitos. Apesar do *Mfn1* ser descrito como localizado exclusivamente na mitocôndria, o seu efeito sobre o desenvolvimento dos oócitos deve ir além de um efeito mitocondrial. Isso pode ser concluído uma vez que oócitos *Mfn1* cKO resultaram em grave efeito sobre o desenvolvimento do oócito, enquanto defeitos de origem mitocondrial normalmente afetam o desenvolvimento do oócito somente durante a maturação (JOHNSON et al., 2007a; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012). Um efeito grave sobre o desenvolvimento folicular também foi notado ao se realizar o nocaute da *Dnm1l* por uso da linhagem Zp3-Cre (UDAGAWA et al., 2014). No entanto, diferente do *Mfn1*, a *Dnm1l* está presente em outras organelas e seu efeito multiorganelar deveu-se principalmente a uma deficiência na secreção de fatores parácrinos derivados do oócitos (UDAGAWA et al., 2014).

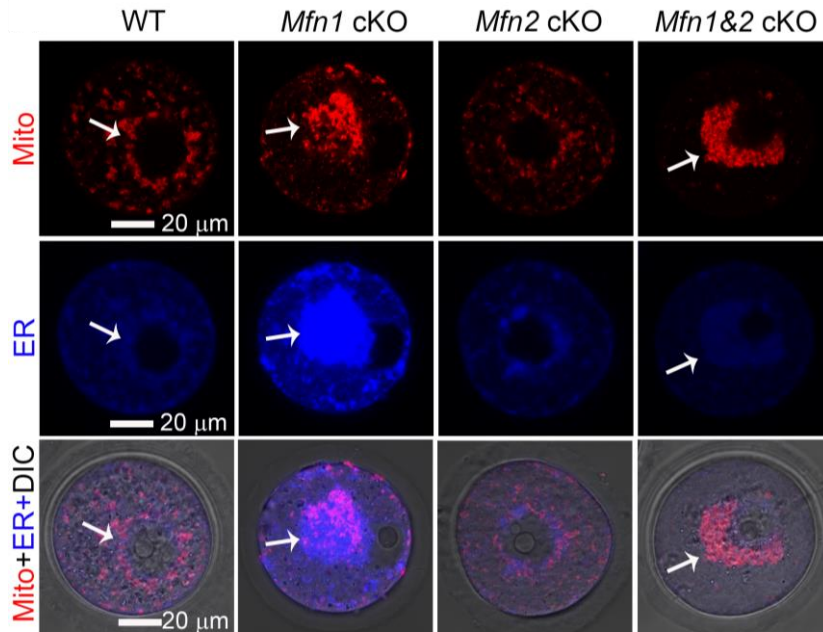
Uma vez que observamos efeitos das mitofusinas sobre a fertilidade, investigamos se os mesmos se associam a um impacto sobre a função mitocondrial no oócito. Para tal, a distribuição das mitocôndrias e do retículo endoplasmático foi analisada em oócitos de fêmeas de 5 semanas de idade. Como esperado e bem descrito (WASSARMAN; JOSEFOWICZ, 1978; JANSEN; DE BOER, 1998; MOTTA et

al., 2000), o nocaute do *Mfn* levou a mitocôndrias fragmentadas, com formato arredondado. Ao invés de se apresentarem de forma distribuída pelo citoplasma, ambas organelas se apresentaram agregadas em 28% dos oócitos *Mfn1* cKO e 47% dos oócitos *Mfn1&2* cKO (Figura 16A e B). Estudos já demonstraram (UDAGAWA et al., 2014) que oócitos deficientes em *Dnm1l* também apresentaram agregação mitocondrial, levando a movimentação mitocondrial restrita e GVBD defeituosa. Durante a maturação, a redistribuição mitocondrial é essencial para suprir a demanda energética do oócito, se aproximando ao redor da vesícula germinativa ou da área do fuso, possibilitando que o ATP seja provido localmente, sem aumento excessivo na atividade oxidativa, e com mínima formação de ERO (VAN BLERKOM; DAVIS; ALEXANDER, 2000; TARÍN; PÉREZ-ALBALÁ; CANO, 2001; YU et al., 2010; VAN BLERKOM, 2011; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012; WAKAI et al., 2014; COTICCHIO et al., 2015; MAY-PANLOUP et al., 2016; CHIARATTI et al., 2018). Assim, a agregação mitocondrial é associada com defeitos na maturação oocitária e disfunção mitocondrial, com consequente baixo potencial de desenvolvimento do gameta (VAN BLERKOM; DAVIS; ALEXANDER, 2000; VAN BLERKOM, 2011; WAKAI et al., 2014). Logo, os grandes agregados nos oócitos *Mfn1&2* cKO e *Mfn1* cKO sugerem que as mitocôndrias disfuncionais incapazes de fornecer o ATP necessário nos locais de agregação. A agregação mitocondrial foi notada desde os oócitos imaturos e se agravou com a maturação (Figura 16C). Assim, a ovulação dos oócitos *Mfn1* cKO e *Mfn1&2* cKO aumentou a agregação mitocondrial, suportando o impacto nas taxas de GVBD e CP1 observadas anteriormente (Figura 12). Logo, o nocaute das mitofusinas afeta a distribuição mitocondrial e do retículo endoplasmático, possivelmente prejudicando a função dessas organelas.

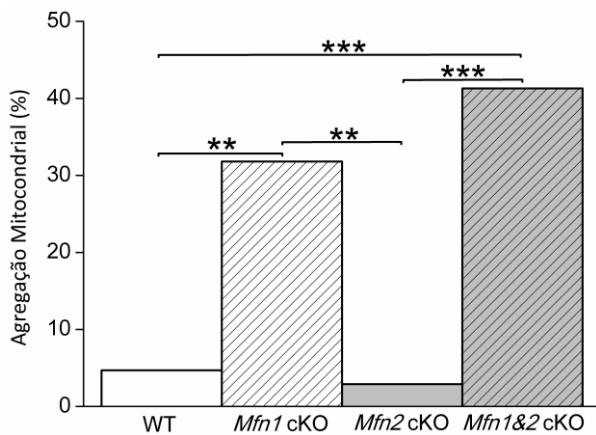


Figura 16 - Agregação mitocondrial e do retículo endoplasmático evidenciam a falha no desenvolvimento de oócitos *Mfn1* cKO e *Mfn1&2* cKO

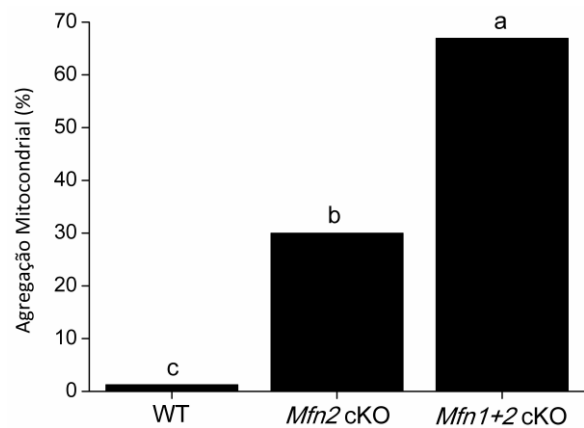
**A**



**B**



**C**



Legenda: (A) Oócitos imaturos isolados de fêmeas com 5 semanas de idade foram corados com MitoTracker CMXRos (Mito) e ERTracker (ER). Nota-se a agregação, como indicativo de disfunção mitocondrial nos grupos *Mfn1* cKO e *Mfn1&2* cKO.

(B) Análise da agregação mitocondrial dos oócitos em (A).

(C) Análise da agregação mitocondrial de oócitos ovulados, agravando o quadro visto em oócitos imaturos.

Acreditamos que o uso de oócitos *Mfn1&2* cKO imaturos deve ter mascarado uma possível disfunção mitocondrial que se acentua com a maturação. As células do

cumulus suprem o oócito com ATP e substratos produtores de energia durante a maior parte da foliculogênese, contudo, com a expansão dessas células antes da ovulação, os oócitos perdem tal suporte e por isso dependem da atividade de suas mitocôndrias para suprir a demanda por ATP (SU et al., 2009; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012; CHIARATTI et al., 2018). Assim, os defeitos mitocondriais afetam mais comumente o oócito durante o período de maturação do que nos estágios iniciais da oogênese (JOHNSON et al., 2007b). Em oócitos que tiveram o gene *Pdha1* nocauteado por uso da linhagem Zp3-Cre, houve um significativo dano mitocondrial, tendo os níveis de ATP reduzidos somente após a ovulação (JOHNSON et al., 2007a). Além disso, a deficiência na maturação meiótica, verificada nos oócitos *Pdha1*<sup>-/-</sup>, é similar aos resultados observados nos oócitos *Mfn1&2* cKO, sugerindo que a infertilidade neste grupo foi causada por um dano sobre a função mitocondrial. Tais resultados indicam, mais uma vez, nossas conclusões anteriores de que a disfunção mitocondrial prejudicou a maturação do oócito em camundongos *Mfn1&2* cKO; além de indicarmos um papel chave de *Mfn2* durante a maturação do oócito, enquanto *Mfn1* parece ser essencial desde os estágios iniciais do desenvolvimento do gameta.

### 7.3 EXPERIMENTO 3: O NOCAUTE DO *Mfn2* PREJUDICA A SELEÇÃO E ELIMINAÇÃO DE MTDNA MUTANTE

Os mecanismos de herança mitocondrial ainda são pouco esclarecidos e a dinâmica mitocondrial pode atuar na segregação dessas organelas durante o desenvolvimento embrionário. Quando as células se encontram em divisão, a fissão mitocondrial durante as fases de G2 e M possibilita que as mitocôndrias sejam fielmente herdadas pelas células filhas (MISHRA; CHAN, 2014). Em oócitos, as mitocôndrias apresentam-se fragmentadas desde as fases iniciais do desenvolvimento (JANSEN; DE BOER, 1998). Embora as razões dessa fragmentação não sejam completamente conhecidas, é provável que esse estado facilite a

segregação mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário inicial (POULTON et al., 2010).

Além disso, nos casos de mutação no mtDNA, a redução na fusão mitocondrial exacerba os efeitos da mutação (NARENDRA et al., 2008; CHEN et al., 2010), provavelmente por interferir na complementação mitocondrial (CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; TWIG et al., 2008). Neste contexto, é plausível considerar que as mitofusinas estão envolvidas na regulação da herança mitocondrial em oócitos. Para testar essa hipótese, os animais foram analisados quanto a quantidade de mtDNA NZB nos oócitos e na progênie. Já é sabido que o mtDNA NZB difere em 91 nucleotídeos do mtDNA C57B/6 e nestes há uma dupla inserção de adenina na posição 9821 do gene mt-Tr que afeta a função mitocondrial (MORENO-LOSHUERTOS et al., 2006). Por tal motivo, camundongos heteroplásmicos eliminam o mtDNA NZB em sua linhagem germinativa (SHARPLEY et al., 2012b). Assim como na literatura, o mesmo foi atestado nas fêmeas WT e seus respectivos oócitos, sendo que quanto maior o nível de mtDNA NZB da fêmea doadora, maior a eliminação de mtDNA NZB nos oócitos (SHARPLEY et al., 2012a) (Figura 17A). Fêmeas com 60-80% de mtDNA NZB apresentaram oócitos com redução de  $13,1\% \pm 1,99$  do mtDNA NZB ( $\Delta$ NZB) (Figura 17A).

Assim foram selecionadas somente fêmeas com 45% a 80% de mtDNA NZB. A partir dessas, analisamos se o mesmo padrão de seleção ocorreria numa condição de nocaute das mitofusinas. Enquanto o grupo *Mfn1* cKO apresentou o mesmo padrão que o WT (Figura 17B), sugerindo que a seleção seja independente do gene *Mfn1*, tanto o grupo *Mfn2* cKO quanto o grupo *Mfn1&2* cKO apresentaram um  $\Delta$  NZB reduzido (lembrando que  $\Delta$  é a diferença entre duas variáveis, no caso o valor de NZB entre mãe e progênie). Além disso, quando os valores de  $\Delta$  NZB de oócitos *Mfn2* cKO e *Mfn1&2* cKO foram plotados em função do nível de mtDNA NZB nas doadoras, não foi verificada uma associação significativa entre as variáveis ( $P = 0,18$ ). Em contrapartida, uma associação de  $R = -0,29$  ( $P < 0,0001$ ) foi observada entre os valores de  $\Delta$  NZB de oócitos WT e *Mfn1* cKO e o nível de mtDNA NZB nas doadoras (Figura 17C-D). A comparação da distribuição do  $\Delta$  NZB entre essas duas populações (WT + *Mfn1* cKO vs. *Mfn2* cKO + *Mfn1&2* cKO) corroborou esse achado (Figura 18A). Ao analisarmos tanto a heteroplasmia dos oócitos (Figura 19A) de cada grupo assim como a progênie dos oócitos WT e *Mfn2* cKO foi constatada a mesma realidade: uma

menor seleção e conseqüente maior quantidade de mtDNA NZB no grupo nocaute para o gene *Mfn2*. Isso se deu tanto na análise de amostra das orelhas dos animais recém desmamados (21 dias), quanto nas amostras de baço e fígado nos animais com 100 dias de idade (Figuras 18B-D).

Esses dados apontam à presença de um mecanismo de eliminação de mtDNA mutante nos oócitos. Vários trabalhos, com humanos (UUSIMAA et al., 2007; WILSON et al., 2016) e camundongos (SATO et al., 2007; FAN et al., 2008; STEWART et al., 2008a; FREYER et al., 2012; SHARPLEY et al., 2012a), já indicaram a existência deste mecanismo, embora sem elucidarem sua forma de ação (STEWART et al., 2008b). Uma vez que o nocaute do *Mfn2*, mas não o do *Mfn1*, é essencial para a ocorrência de mitofagia (HAILEY et al., 2010; ZHAO et al., 2012; CHEN; DORN, 2013), é provável que esta seja a base para a eliminação do mtDNA NZB nos oócitos. Sabe-se que em condições normais, a proteína Pink1 é importada pela mitocôndria e degradada em seu interior, sendo um evento dependente do  $\Delta\Psi_m$  (LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014; SCARFFE et al., 2014). Porém, sob condições de despolarização mitocondrial, Pink1 se acumula na mitocôndria disfuncional e fosforila a MFN2 (CHEN; DORN, 2013; NI; WILLIAMS; DING, 2015). Conseqüentemente, Parkin é recrutado do citoplasma e poli-ubiquitina MFN2 e outras proteínas da membrana mitocondrial externa. A ubiquitinação dessas proteínas atrai outros complexos como a histona deacetilase 6 (HDAC6) e o sequestosome 1 (P62/SQSTM1), que interagem com os domínios de ubiquitina e com componentes dos autofagossomos (CHEN; DORN, 2013; LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014; SCARFFE et al., 2014; NI; WILLIAMS; DING, 2015). Em especial, HDAC6 e P62/SQSTM1 interagem com a forma lipídada de MAP1LC3B, o qual está localizado na membrana do autofagossomo (LC3-I) e sofre lipidação (LC3-II) em resposta ao sinal autofágico. Como resultado, autofagossomos são atraídos para a mitocôndria disfuncional, levando ao seu engolfamento e posterior catabolismo nos lisossomos (CHEN; DORN, 2013; LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014; SCARFFE et al., 2014; NI; WILLIAMS; DING, 2015). O nocaute do *Mfn2* pode ter interferido nesta via de eliminação mitocondrial (e.g., mitocôndrias com mtDNA NZB) uma vez que o *Mfn2* é indispensável para o recrutamento de Parkin (CHEN; DORN, 2013). Além disso, o nocaute também poderia ter interferido nesta via por

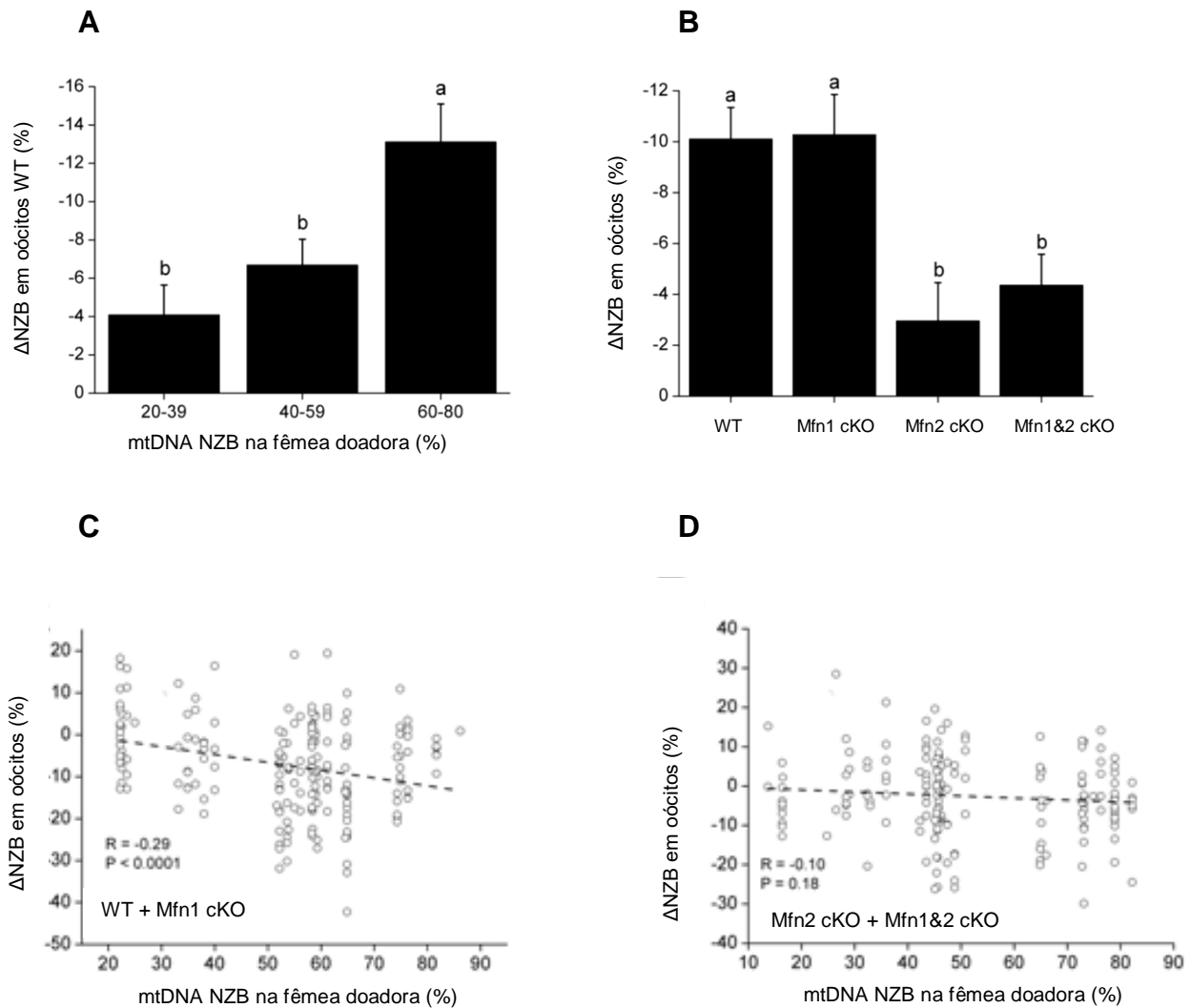
afetar a formação de autofagossomos (HAILEY et al., 2010) e a posterior fusão desses com lisossomos (ZHAO et al., 2012).

Analisamos também o padrão do  $\Delta$  NZB ao longo das diferentes gerações de filhotes de uma mesma fêmea, não tendo sido vista diferença (Figura 19B). Tal experimento foi realizado, uma vez que Sato *et al.* (SATO et al., 2007), ao fazer uso um modelo murino com deleção no mtDNA semelhante ao ocorrido na Síndrome de Kearns-Sayre (INOUE et al., 2000), reportaram uma diminuição do nível de mtDNA mutado nos oócitos em função das gerações, chegando até a alguns descendentes de gerações posteriores não apresentarem mais a mutação que seus irmãos (de ninhadas anteriores) tinham. Em outro estudo de Fan *et al.* (FAN et al., 2008), foi relatado que em fêmeas heteroplásmicas para uma mutação pontual no gene *Mt-nd6* foi semelhantemente constatada uma eliminação de mtDNA mutante nos oócitos, dependente da idade, levando a produção de descendentes livres da mutação. Diversos estudos já demonstraram que a transmissão de patologias ocasionadas por mutações no mtDNA passam por mecanismos de seleção ao longo de poucas gerações, restabelecendo um condição de homoplasma (HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; KOEHLER et al., 1991; JENUTH et al., 1996; MEIRELLES; SMITH, 1997; SATO et al., 2007; FAN et al., 2008; STEWART et al., 2008a; FREYER et al., 2012; MA; XU; O'FARRELL, 2014). Possivelmente este alto nível de seleção, mais evidentes nesses casos do que em nosso experimento, se deveu a gravidade funcional decorrente da mutação, uma vez que diversos estudos já constataram um nível de seleção mais forte dependente de sua interferência no comprometimento funcional da organela (JENUTH et al., 1996; BROWN et al., 2001; POULTON et al., 2010; FREYER et al., 2012).

Tais resultados embasam a hipótese de que o *Mfn2* desempenha papel essencial na identificação e eliminação de mitocôndrias disfuncionais, podendo ser pela presença de mtDNA mutante, por mitofagia. No entanto, independentemente de como o *Mfn2* interferiu na eliminação do mtDNA NZB, um dos principais achados desta fase do trabalho fornece é que o nocaute do *Mfn2* nos oócitos teve como consequência o aumento dos níveis de mtDNA NZB nos oócitos (Figura 18A); e isso não se restringiu ao gameta feminino já que fêmeas do grupo *Mfn2* cKO também

produziram descendentes com maiores níveis da mutação mitocondrial (Figuras 18B, C e D).

Figura 17 - Grau de eliminação de mtDNA NZB

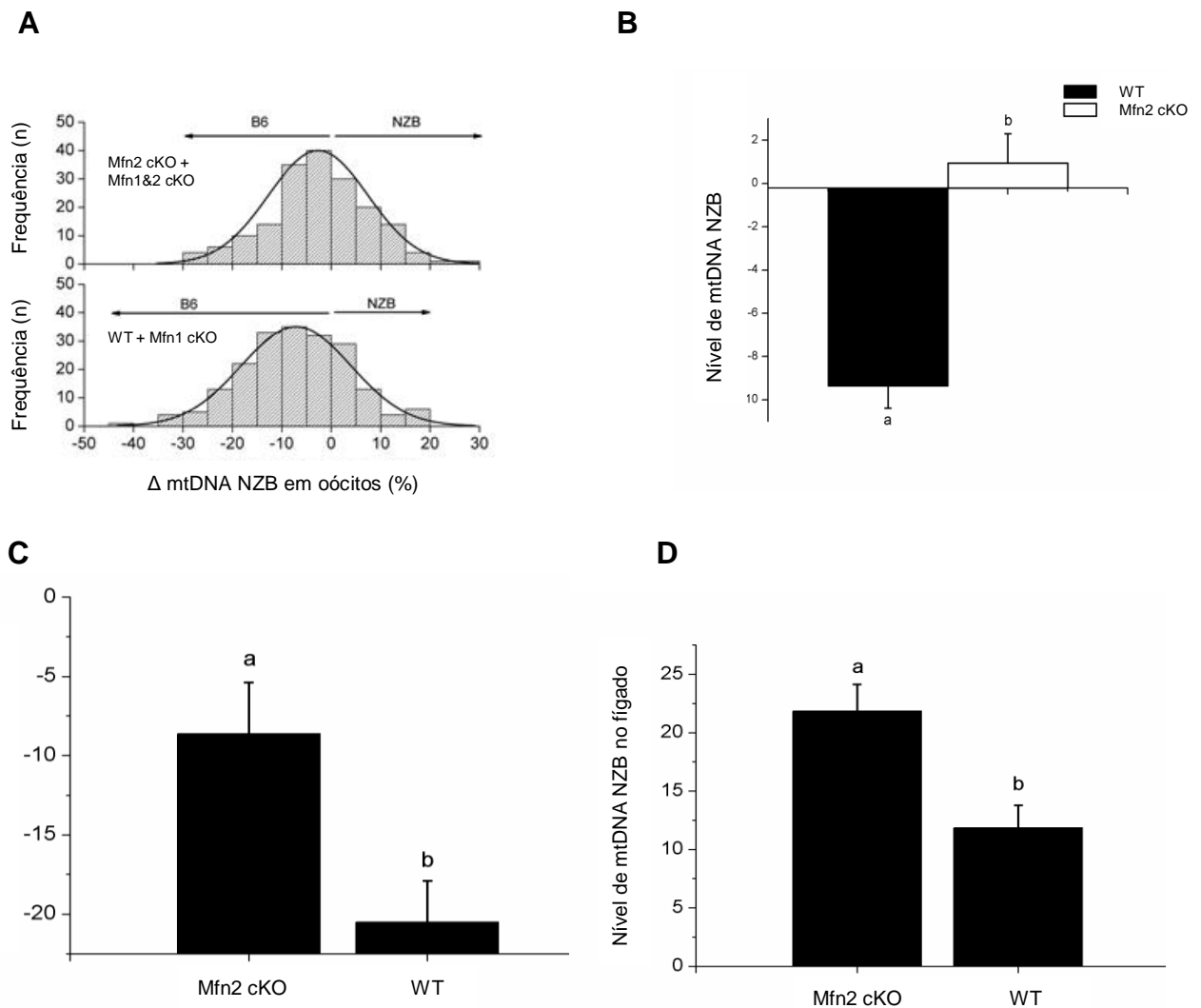


Legenda: (A) Oócitos obtidos de fêmeas WT com 5 semanas de idade foram classificados de acordo com o nível de mtDNA NZB na fêmea doadora. O  $\Delta$  NZB foi obtido pela diferença de mtDNA NZB entre o oócito e a respectiva fêmea doadora. Nota-se uma maior seleção contra o mtDNA NZB à medida que a fêmea doadora possui maior quantidade do mesmo. Grupos indicados por letras diferentes sobre as barras diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

(B) Oócitos controle e nocautes de fêmeas com  $>45\%$  de mtDNA NZB foram comparados quanto ao  $\Delta$  NZB. O gráfico evidencia uma menor capacidade de seletiva dos grupos Mfn2 cKO e Mfn1&2 cKO contra o mtDNA NZB. Grupos indicados por letras diferentes sobre as barras diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).

(C-D) Correlação ( $R$ ) entre o nível de mtDNA NZB na fêmea doadora e o  $\Delta$  NZB para os grupos WT + Mfn1 cKO (C) versus os grupos Mfn2 cKO + Mfn1&2 cKO (D). Somente em (C) foi observado correlação significativa entre as variáveis ( $P < 0,0001$ ).

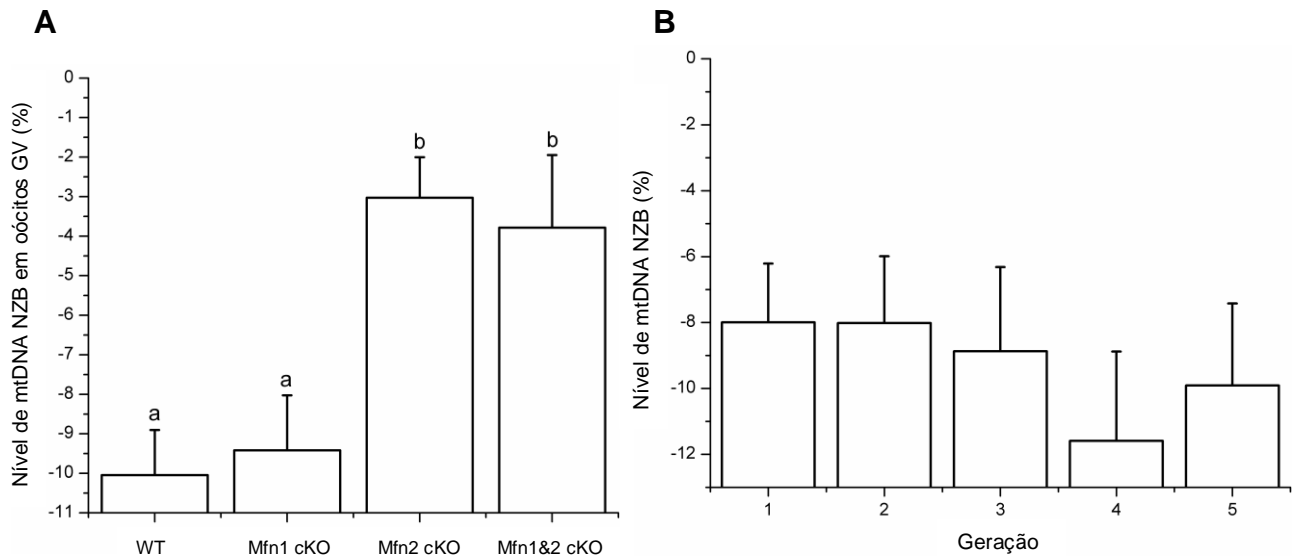
Figura 18 - Distribuição de mtDNA NZB nas populações e em diferentes tecidos



Legenda: (A) Frequência de oócitos com níveis variados de  $\Delta$  NZB para os grupos Mfn2 cKO + Mfn1&2 cKO versus WT + Mfn1 cKO. As setas acima dos histogramas indicam que oócitos Mfn2 cKO + Mfn1&2 cKO se distribuem homogêneo considerando  $\Delta$  NZB maior ou menor que 0, enquanto que oócitos WT + Mfn1 cKO apresentam uma distribuição deslocada no sentido do  $\Delta$  NZB menor que 0.

(B-D) A progênie de oócitos WT e Mfn2 cKO foi comparada quanto ao  $\Delta$  NZB considerando três diferentes tecidos, sendo a orelha coletada aos 21 dias de idade (B), baço coletado aos 100 dias de vida (C) e fígado coletado aos 100 dias de vida (D). Em todos os casos o nocaute para *Mfn2* mostra-se prejudicial para identificação e eliminação de mtDNA mutante. Somente fêmeas progenitoras com >45% de mtDNA NZB foram consideradas.

Figura 19 - Nível de mtDNA NZB em oócitos GV e ao longo das gerações



Legenda: (A) Níveis de mtDNA NZB em oócitos GV. Níveis baixos nos oócitos do WT e de Mfn1 cKO, enquanto que é observado um de nível elevado em oócitos de Mfn2 cKO e de Mfn1&2 cKO; mais uma vez afirmando os dados anteriores.

(B) Nível de NZB mtDNA analisado com relação a diferentes gerações de uma mesma fêmea. Não foi observado diminuição através de gerações. Grupos indicados por letras diferentes sobre as barras diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ).



# CONCLUSÕES

---

## 8 CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da fusão em oócitos de murinos com relação a fertilidade e herança mitocondrial, sendo que, para tal, realizamos três etapas de análises:

1° Avaliamos a capacidade de desenvolvimento a termo, o número de animais nascidos e o ganho de peso da progênie de fêmeas.

2° o número de oócitos ovulados, o diâmetro oocitário, o número de cópias de mtDNA e a distribuição mitocondrial nos oócitos de fêmeas.

3° o nível de mtDNA NZB nos oócitos (maturos e imaturos) e nos tecidos somáticos da progênie (na orelha ao desmame e na calda, baço e fígado aos 100 dias de idade) de fêmeas.

Assim, foi possível obter as seguintes conclusões:

**No que concerne a hipótese original do trabalho de que a parada da fusão otimizaria e favoreceria a segregação e eliminação do mtDNA NZB, sendo um mecanismo de controle positivo contra mtDNA mutado e/ou disfuncional:**

- O nocaute das mitofusinas não otimizou a eliminação do mtDNA NZB.

**No desenvolver estudo, outras hipóteses foram criadas. Uma delas foi que um desbalanço acentuado entre fusão e fissão interfere negativamente no desenvolvimento folicular e adequado crescimento do oócito:**

- Tal hipótese foi confirmada, principalmente pela ação do *Mfn1*. Apesar do *Mfn2* não parecer ter efeito sobre a competência oocitária, o *Mfn1* apresentou diversos relacionados a disfunção mitocondrial que levaram a um bloqueio do desenvolvimento folicular e consequente infertilidade. O *Mfn2* parece ter maior influência na maturação oocitária.

**Uma terceira e última hipótese elaborada ao longo do projeto é de que o *Mfn2* atua no processo de eliminação de mitocôndrias disfuncionais, afetando o processo de herança mitocondrial:**

- O *Mfn2* desfavoreceu a eliminação do mtDNA NZB, provavelmente devido ao fato de estar altamente relacionada ao processo mitofágico.

Conclui-se, portanto, que o *Mfn1* é essencial para promover oócitos com competência de desenvolvimento, enquanto que o *Mfn2* é necessário para a eliminação de mtDNA mutante no oócito; o que demonstra a grande implicação da ação das mitofusinas no gameta feminino sobre a fertilidade e herança mitocondrial. Apesar da rede mitocondrial ser fragmentada em oócitos, o processo de fusão se mostra importante para a manutenção do desenvolvimento oocitário e herança mitocondrial, já que o nocaute de *Mfn1* ou *Mfn2* tem efeitos prejudiciais ao gameta em tais aspectos. A fusão é necessária para garantir a homogeneização do conteúdo mitocondrial dentro da célula, o que é ainda mais importante considerando o enorme volume citoplasmático dos oócitos. Um desbalanceamento entre a fusão e a fissão (mesmo que essa segunda se apresente de forma mais ativa no momento estudado por este trabalho) leva a danos como vistos no estudo. A compreensão de tais mecanismos biomoleculares se comprova fundamental e de alto impacto para a sociedade, uma vez que interferem diretamente na fertilidade materna e herança mitocondrial que podem ou não levar a doenças genéticas severas.

# REFERÊNCIAS

---

## 9 REFERÊNCIAS

- AIKEN, C. E. et al. Decreased ovarian reserve, dysregulation of mitochondrial biogenesis, and increased lipid peroxidation in female mouse offspring exposed to an obesogenic maternal diet. **FASEB Journal**, v. 30, n. 4, p. 1548–1556, 2016.
- AL RAWI, S. et al. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6059, p. 1144–7, 25 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033522>>. Acesso em: 21 ago. 2013.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ASHRAFIAN, H. et al. A mutation in the mitochondrial fission gene Dnm1l leads to cardiomyopathy. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 6, p. 1–18, 2010.
- BATTERSBY, B. J.; LOREDO-OSTI, J. C.; SHOUBRIDGE, E. A. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. **Nature genetics**, v. 33, n. 2, p. 183–6, fev. 2003.
- BAYONA-BAFALUY, M. P. et al. Revisiting the Mouse Mitochondrial DNA Sequence. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 18, p. 5349–5355, set. 2003.
- BAYONA-BAFALUY, M. P. et al. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 40, p. 14392–7, out. 2005.
- BERGMAN, O.; BEN-SHACHAR, D. Mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) deficits in schizophrenia: Possible interactions with cellular processes. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 457–469, 2016.
- BIFFI, S. et al. Quantification of Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations for DNA Samples in the Low Picogram Range by Nested Real-time ARMS-qPCR. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 20, n. 2, p. 117–122, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532488>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ

and somatic cells. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003840>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

BOGENHAGEN, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1819, n. 9–10, p. 914–20, 2012.

BROWN, D. T. et al. 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.

BURGSTALLER, J. P. et al. MtDNA segregation in heteroplasmic tissues is common in vivo and modulated by haplotype differences and developmental stage. **Cell reports**, v. 7, n. 6, p. 2031–41, 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910436>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

BUSCH, K. B. et al. Quality matters : how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity ? 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, p. 20130442, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24864312>>.

CAO, L. et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. **Nature genetics**, v. 39, n. 3, p. 386–90, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293866>>. Acesso em: 8 jul. 2014.

CHAN, D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 79–99, jan. 2006a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704336>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

CHAN, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1241–52, 30 jun. 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814712>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

CHAN, D. C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 265–87, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934639>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

CHEN, H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 189–200, 2003.

CHEN, H. et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 280–289, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.026>>.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Physiological functions of mitochondrial fusion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, p. 21–5, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649534>>. Acesso em: 31 mar. 2016.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. **Cell metabolism**, v. 26, n. 1, p. 39–48, 5 jul. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413117303406>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

CHEN, H.; CHOMYN, A.; CHAN, D. C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26185–26192, 2005.

CHEN, H.; MCCAFFERY, J. M.; CHAN, D. C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 548–62, 10 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693261>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

CHEN, Y.; DORN, G. W. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6131, p. 471–5, 26 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620051>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

CHEN, Y.; LIU, Y.; DORN, G. W. 2nd. Mitochondrial Fusion Is Essential for Organelle Function and Cardiac Homeostasis. **Circulation research**, v. 109, n. 12, p. 1327–1331, dez. 2011.

CHIARATTI, M. R. et al. **Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development** *Mitochondrion*, 2011. .

CHIARATTI, M. R. et al. The role of mitochondria in the female germline: Implications

to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. **Cell Biology International**, 1 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29418047>>. Acesso em: 7 maio. 2018.

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, jul. 2010.

CHIONG, M. et al. Mitochondrial Metabolism and the Control of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, p. 72, 2014.

CIPOLAT, S. et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 15927–15932, 2004.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, Ré. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 799–808, 2012.

COTICCHIO, G. et al. Oocyte Maturation: Gamete-Somatic Cells Interactions, Meiotic Resumption, Cytoskeletal Dynamics and Cytoplasmic Reorganization. **Human reproduction update**, v. 21, n. 4, p. 427–454, 2015.

CRAN, D. G. The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. **Gamete Research**, v. 18, n. 1, p. 67–76, set. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507363>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

CREE, L. M. et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 249–54, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223651>>. Acesso em: 19 ago. 2013.

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, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

DAI, Y. et al. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic



mitochondrial DNA mutation. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 3, p. 637–647, 2014.

DANINO, D.; HINSHAW, J. E. Dynamin Family of Mechanoenzymes. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 4, p. 454–460, ago. 2001.

DE VRIES, W. N. et al. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 26, n. 2, p. 110–2, fev. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686600>>.

Acesso em: 22 set. 2016.

DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 11, p. 870–9, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928812>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

DORN, G. W. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. **EMBO Molecular Medicine**, 10 abr. 2015. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/content/early/2015/04/10/emmm.201404575.abstract>>.

EKERT, B. Effect of  $\gamma$ -rays on Thymine in De-aerated Aqueous Solutions. **Nature**, v. 194, n. 4825, p. 278–279, 21 abr. 1962. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/194278a0>>. Acesso em: 11 ago. 2014.

FALKENBERG, M.; LARSSON, N.-G.; GUSTAFSSON, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 679–99, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408359>>. Acesso em: 25 maio. 2014.

FAN, W. et al. A Mouse Model of Mitochondrial Disease Reveals Germline Selection Against Severe mtDNA Mutations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5865, p. 958–962, 2008.

FERREIRA, C. R. et al. 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, mar. 2010.

FOOTE, C. S. Mechanisms of Photosensitized Oxidation. **Science**, v. 162, n. 3857, p. 963–970, 29 nov. 1968. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/162/3857/963.short>>. Acesso em: 1 ago. 2014.

- FRAGOULI, E.; WELLS, D. Mitochondrial DNA Assessment to Determine Oocyte and Embryo Viability. **Seminars in reproductive medicine**, v. 33, n. 6, p. 401–9, 13 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1567821>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- FREYER, C. et al. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. **Nature genetics**, n. October, out. 2012.
- HAILEY, D. W. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656–67, 14 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478256>>. Acesso em: 31 jul. 2016.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. [s.l.] Clarendon Press, 1985.
- HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **Sci. Aging Knowl. Environ.**, v. 2002, n. 37, p. cp14-, 18 set. 2002. Disponível em: <<http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/2002/37/cp14>>. Acesso em: 11 ago. 2014.
- 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, ago. 1982. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=346741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- 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, abr. 2014.
- HOPPINS, S.; LACKNER, L.; NUNNARI, J. The machines that divide and fuse mitochondria. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 751–80, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362197>>. Acesso em: 14 mar. 2016.
- INOUE, K. et al. 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.

ISHIHARA, N. et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. **Nature cell biology**, v. 11, n. 8, p. 958–66, ago. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578372>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

ISHIHARA, N.; EURA, Y.; MIHARA, K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 26, p. 6535–46, 15 dez. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572413>>. Acesso em: 22 set. 2016.

JAGARLAMUDI, K. et al. Oocyte-Specific Deletion of Pten in Mice Reveals a Stage-Specific Function of PTEN/PI3K Signaling in Oocytes in Controlling Follicular Activation. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6186, jul. 2009.

JANSEN, R. P. S.; DE BOER, K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 81–88, 1998.

JENUTH, J. P. et al. 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.

JENUTH, J.; PETERSON, A.; SHOUBRIDGE, E. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. **Nature genetics**, v. 16, p. 93–95, 1997.

JOHNSON, K. R. et al. A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. **Nature genetics**, v. 27, n. 2, p. 191–4, 2001.

JOHNSON, M. T. et al. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. **Biol Reprod**, v. 77, n. 1, p. 2–8, 2007a.

Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17314311](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17314311)>.

JOHNSON, M. T. et al. Oxidative Metabolism of Pyruvate Is Required for Meiotic Maturation of Murine Oocytes In Vivo1. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 2–8, 2007b.

KEEFE, D.; KUMAR, M.; KALMBACH, K. Oocyte Competency Is the Key to Embryo

Potential. **Fertility and sterility**, v. 103, n. 2, p. 317–322, fev. 2015.

KOEHLER, C. M. et al. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. **Genetics**, v. 129, n. 1, p. 247–255, 1991.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–43, 15 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490900269X>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

LABBÉ, K.; MURLEY, A.; NUNNARI, J. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 357–91, 6 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-101011-155756>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

LARSSON, N.-G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annual review of biochemistry**, v. 79, n. March, p. 683–706, jan. 2010.

LEE, H.-S. et al. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. **Cell reports**, v. 1, n. 5, p. 506–15, 31 maio 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3372871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [s.l: s.n.]

LEWANDOSKI, M.; WASSARMAN, K. M.; MARTIN, G. R. Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. **Current biology : CB**, v. 7, n. 2, p. 148–51, 1 fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9016703>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

LIU, Q. et al. Mitofusin 2 regulates the oocytes development and quality by modulating meiosis and mitochondrial function. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 30561, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep30561>>.

LOVELAND, B. et al. Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: A hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. **Cell**, v. 60, n. 6, p. 971–980, 1990. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286749090345F>>.

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, maio 2014.

MACHADO, T. S. et al. Real-time PCR quantification of heteroplasmy in a mouse model with mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ strains. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

MAHROUS, E.; YANG, Q.; CLARKE, H. J. Regulation of Mitochondrial DNA Accumulation during Oocyte Growth and Meiotic Maturation in the Mouse. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 144, n. 2, p. 177–185, ago. 2012.

MALENA, A. et al. Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 18, p. 3407–16, 15 set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561330>>. Acesso em: 11 set. 2013.

MAY-PANLOUP, P. et al. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. **Current topics in developmental biology**, v. 77, n. 06, p. 51–83, jan. 2007.

MAY-PANLOUP, P. et al. Ovarian Ageing: The Role of Mitochondria in Oocytes and Follicles. **Human reproduction update**, v. 22, n. 6, p. 725–743, nov. 2016.

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, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1207808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MELDRUM, D. R. et al. Aging and the Environment Affect Gamete and Embryo Potential: Can We Intervene? **Fertility and sterility**, v. 105, n. 3, p. 548–559, mar. 2016.

MICHAELS, G. S.; HAUSWIRTH, W. W.; LAIPIS, P. J. **Mitochondrial DNA copy**

**number in bovine oocytes and somatic cells***Developmental Biology*, 1982. .

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 10, p. 634–46, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4250044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MORENO-LOSHUERTOS, R. et al. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. **Nature genetics**, v. 38, n. 11, p. 1261–8, 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013393>>.

MOTTA, P. M. et al. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15 Suppl 2, p. 129–47, jul. 2000.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041520>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

NAGY, A. et al. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. In:

**Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. 3rd ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. p. 764.

NAKAMURA, K. et al. Effect of Centrifugation of Mouse Eggs on Their Development In Vitro and In Vivo. **Gamete Research**, v. 15, p. 83–86, 1986.

NARENDRA, D. et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **The Journal of cell biology**, v. 183, n. 5, p. 795–803, dez. 2008.

NASS, M. M. K. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS: I. Fixation and Electron Staining Reactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 593–611, 1 dez. 1963a. Disponível em:

<<http://jcb.rupress.org/content/19/3/593.abstract>>. Acesso em: 11 ago. 2014.

NASS, S. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS: II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. **The Journal of Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 613–629, 1 dez. 1963b. Disponível em:

<<http://jcb.rupress.org/content/19/3/613.abstract>>. Acesso em: 11 ago. 2014.

NEWTON, C. R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification

refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 7, p. 2503–2516, 11 abr. 1989. Disponível em:

<<http://nar.oxfordjournals.org/content/17/7/2503.abstract>>. Acesso em: 7 ago. 2014.

NI, H.-M.; WILLIAMS, J. A.; DING, W.-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. **Redox Biology**, v. 4, p. 6–13, 2015.

NICKLAS, J. A. et al. 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. 313–20, jan. 2004.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476199>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

OGILBY, P. R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun.

**Chemical Society reviews**, v. 39, n. 8, p. 3181–209, 22 ago. 2010. Disponível em:

<<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b926014p>>. Acesso em: 11 ago. 2014.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a Classification of Oocytes and Follicles in the Mouse Ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 17, n. 3, p. 555–557, dez. 1968.

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, ago. 1973. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2109054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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. et al. Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them. **PLoS genetics**, v. 6, n. 8, ago. 2010. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2920841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

POULTON, J.; BREDENOORD, a L. 174th ENMC international workshop: Applying pre-implantation genetic diagnosis to mtDNA diseases: implications of scientific advances 19-21 March 2010, Naarden, The Netherlands. **Neuromuscular**

**disorders : NMD**, v. 20, n. 8, p. 559–63, ago. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627569>>. Acesso em: 11 set. 2013.

PRAEFCKE, G. J. K.; MCMAHON, H. T. The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 2, p. 133–147, fev. 2004.

RAHMAN, S. et al. Report Decrease of 3243 ArG mtDNA Mutation from Blood in MELAS Syndrome: A Longitudinal Study. **American Journal of Human Genetics, The**, p. 238–240, 2001.

RAJASIMHA, H.; CHINNERY, P.; SAMUELS, D. Selection against pathogenic mtDNA mutations in a stem cell population leads to the loss of the 3243A→G mutation in blood. **The American Journal of ...**, n. February, p. 333–343, 2008.

REYNIER, P. et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular human reproduction**, v. 7, n. 5, p. 425–9, maio 2001.

ROUBERTOUX, P. L. et al. Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. **Nature genetics**, v. 35, n. 1, p. 65–9, 2003.

SANTEL, A. et al. Mitofusin-1 Protein Is a Generally Expressed Mediator of Mitochondrial Fusion in Mammalian Cells. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 13, p. 2763–2774, jul. 2003.

SATO, A. et al. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. **Genetics**, v. 177, n. 4, p. 2031–7, dez. 2007.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2219472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 set. 2013.

SCARFFE, L. a et al. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 6, p. 315–24, jun. 2014.

SCHON, E. A. Complements of the house. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 6, p. 760–762, 2004.

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, dez. 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3959762&tool=pmcentrez>>



z&rendertype=abstract>. Acesso em: 23 maio. 2014.

SCHREPFER, E.; SCORRANO, L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism.

**Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 683–694, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.022>>.

SHADEL, G. S.; ROAD, C.; CLAYTON, D. A. MITOCHONDRIAL DNA. 1997.

SHARPLEY, M. S. et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 333–343, 2012a.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.004>>.

SHARPLEY, M. S. et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 333–343, 2012b.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.004>>.

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. **Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte** **Current Topics in Developmental Biology**, 2007. .

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Medicine. Sidestepping mutational meltdown. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5865, p. 914–915, 2008.

ST. JOHN, J. C. **Mitochondrial DNA: Fate of the Paternal Mitochondrial**

**Genome** **eLS: Major Reference Works.**, 8 dez. 2013. . Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0006165.pub2>>.

STEINBORN, R. et al. Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Cloned Cattle Produced by Fetal and Adult Cell Cloning. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 255–257, jul. 2000.

STEWART, J. B. et al. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 0063–0071, 2008a.

STEWART, J. B. et al. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 9,

n. 9, p. 657–662, set. 2008b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695671>>.

SU, Y. et al. Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function : Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism. **Seminars in Reproductive**

**Medicine**, v. 27, n. 1, p. 32–42, 2009.

SUEN, D.-F. et al. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic hybrid cells. **Proceedings of the National Academy of**

**Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11835–40, 29 jun.

2010. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2900690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 jul. 2014.

SUN, Q.-Y.; LIU, K.; KIKUCHI, K. Oocyte-Specific Knockout: A Novel In Vivo Approach for Studying Gene Functions During Folliculogenesis, Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1014–1020, 2008. Disponível em:

<<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.108.070409>>.

SUTOVSKY, P. et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 371–372, 1999.

SUTOVSKY, P. et al. 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, fev. 1999.

TANAKA, A. et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. **The Journal of cell biology**, v. 191, n. 7, p. 1367–80, dez. 2010.

TARÍN, J. J.; PÉREZ-ALBALÁ, S.; CANO, a. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. **Biology of reproduction**, v. 65, n. January, p. 141–150, 2001.

TATHAM, B. G. et al. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 11, n. 7, p. 1499–503, jul. 1996. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671492>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

TILLY, J. L.; SINCLAIR, D. A. Germline energetics, aging, and female infertility. **Cell metabolism**, v. 17, n. 6, p. 838–50, 4 jun. 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413113001976>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

TSUKAMOTO, S. et al. Autophagy is essential for preimplantation development of

mouse embryos. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5885, p. 117–20, 4 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599786>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO journal**, v. 27, n. 2, p. 433–46, 23 jan. 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2234339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

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

UDAGAWA, O. et al. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. **Current Biology**, v. 24, n. 20, p. 2451–2458, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.060>>.

UUSIMAA, J. et al. Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. **Annals of neurology**, v. 62, n. 3, p. 278–87, set. 2007.

VAN BLERKOM, J. Mitochondria in Human Oogenesis and Preimplantation Embryogenesis: Engines of Metabolism, Ionic Regulation and Developmental Competence. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 128, n. 3, p. 269–280, set. 2004.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 797–813, set. 2011. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724910001674>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15, n. 12, p. 2621–33, dez. 2000.

VAN DER BLIEK, A. M. Functional Diversity in the Dynamin Family. **Trends in cell biology**, v. 9, n. 3, p. 96–102, mar. 1999.

- VRIES, R. L. A. De et al. Being sick is not enough Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . n. April, p. 699–700, 2012.
- WAI, T. et al. 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, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029901>>. Acesso em: 23 maio. 2014.
- WAKAI, T. et al. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 1090–1100, 2014.
- 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, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2821041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 jul. 2014.
- WALLACE, D. C. et al. Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. 2014.
- WANG, J. et al. Analysis of Mitochondrial DNA Point Mutation Heteroplasmy by ARMS Quantitative PCR. In: **Current Protocols in Human Genetics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. Chapter 19p. Unit 19.6.
- WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. **Journal of Morphology**, v. 156, n. 2, p. 209–235, maio 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/642015>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- WILSON, I. J. et al. Mitochondrial DNA sequence characteristics modulate the size of the genetic bottleneck. **Human molecular genetics**, v. 25, n. 5, p. 1031–41, mar. 2016.
- WOODS, D. C.; TILLY, J. L. Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer (AUGMENT) in Human Assisted Reproduction. **Seminars in reproductive**

**medicine**, v. 33, n. 6, p. 410–21, 17 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1567826>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

WU, L. L. et al. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. **Development**, v. 142, n. 4, p. 681–691, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25670793>%5Cn<http://dev.biologists.org/content/142/4/681.full.pdf>>.

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, jan. 2011.

YU, Y. et al. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n. 3, p. 672–80, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578238>>. Acesso em: 22 set. 2016.

ZENG, H.-T. et al. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of in Vitro-Matured Mouse Oocytes. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 2, p. 47, ago. 2014.

ZHANG, J.-H. et al. Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation. **Scientific reports**, v. 6, p. 30970, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27485634>>.

ZHAO, T. et al. Central role of mitofusin 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 28, p. 23615–23625, 2012.

ZORZANO, A. et al. Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 12, p. 1020–31, 20 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567790>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

# **ANEXOS**

---

## 10 ANEXOS

ANEXO 1. Reprodução autorizada pela PLOS do manuscrito intitulado “Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains” publicado no periódico PLOS One.

## RESEARCH ARTICLE

# Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains

Thiago Simões Machado<sup>1,2,3,4\*</sup>, Carolina Habermann Macabelli<sup>1,3,4†</sup>, Juliano Rodrigues Sangalli<sup>2,3</sup>, Thiago Bittencourt Rodrigues<sup>1</sup>, Lawrence Charles Smith<sup>2,4</sup>, Flávio Vieira Meirelles<sup>2,3</sup>, Marcos Roberto Chiaratti<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 13565–905, Brazil, **2** Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508–270, Brazil, **3** Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 13635–900, Brazil, **4** Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada

\* These authors contributed equally to this work.

† These authors are co-first authors on this work.

\* [chiarattimr@gmail.com](mailto:chiarattimr@gmail.com)


 OPEN ACCESS

**Citation:** Machado TS, Macabelli CH, Sangalli JR, Rodrigues TB, Smith LC, Meirelles FV, et al. (2015) Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains. PLoS ONE 10(8): e0133650. doi:10.1371/journal.pone.0133650

**Editor:** Marc Liesa, Boston University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** March 11, 2015

**Accepted:** June 30, 2015

**Published:** August 14, 2015

**Copyright:** © 2015 Machado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was granted by São Paulo Research Foundation (FAPESP; [www.fapesp.br](http://www.fapesp.br)). Grant numbers 2013/23408-5 (MRC), 2012/50231-6 (MRC), 2012/12951-7 (MRC), 2010/09561-7 (FVM), 2010/13384-3 (FVM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interest exist.

## Abstract

Mouse models are widely employed to study mitochondrial inheritance, which have implications to several human diseases caused by mutations in the mitochondrial genome (mtDNA). These mouse models take advantage of polymorphisms between the mtDNA of the NZB/BINJ and the mtDNA of common inbred laboratory (i.e., C57BL/6) strains to generate mice with two mtDNA haplotypes (heteroplasmy). Based on PCR followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), these studies determine the level of heteroplasmy across generations and in different cell types aiming to understand the mechanisms underlying mitochondrial inheritance. However, PCR-RFLP is a time-consuming method of low sensitivity and accuracy that depends on the use of restriction enzyme digestions. A more robust method to measure heteroplasmy has been provided by the use of real-time quantitative PCR (qPCR) based on allelic refractory mutation detection system (ARMS-qPCR). Herein, we report an ARMS-qPCR assay for quantification of heteroplasmy using heteroplasmic mice with mtDNA of NZB/BINJ and C57BL/6 origin. Heteroplasmy and mtDNA copy number were estimated in germline and somatic tissues, providing evidence of the reliability of the approach. Furthermore, it enabled single-step quantification of heteroplasmy, with sensitivity to detect as low as 0.1% of either NZB/BINJ or C57BL/6 mtDNA. These findings are relevant as the ARMS-qPCR assay reported here is fully compatible with similar heteroplasmic mouse models used to study mitochondrial inheritance in mammals.



## Introduction

In mammals, the mitochondrial genome (mtDNA) encodes 13 polypeptides that are essential subunits of the enzyme complexes in the oxidative phosphorylation pathway [1,2]. As there are hundreds to several thousands of mtDNA molecules per cell, mutations in mtDNA are often present in a heteroplasmic state (i.e., coexistence of wild-type and mutant mtDNA) within single cells. Furthermore, due to poorly understood mechanisms, the mutation load varies markedly from one generation to another, which may result in mitochondrial dysfunction [1–4]. Since mutations in mtDNA have been implicated in several maternally-inherited human diseases [2], there is a growing interest in developing animal models to address the mechanisms underlying mitochondrial inheritance. For instance, several groups have developed heteroplasmic mice containing mtDNA of two different strains [5–13]. As the mtDNA haplotype of the NZB/BINJ (NZB) strain differs by dozens of nucleotides from the mtDNA haplotype of most laboratory inbred strains [8,14,15], including BALB/cByJ and C57BL/6 (B6), NZB mice are often used as a source of polymorphic mtDNA [5–12]. Hence, heteroplasmic mice are generated by mixing cytoplasm from two zygotes that differ in their mtDNA haplotype (i.e., NZB and B6 strains), followed by embryo transfer to foster mothers [6,7,11]. Since heteroplasmic mice are viable, the level of NZB mtDNA can be tracked down to study mitochondrial inheritance in different cell types and across generations [5–13].

The level of NZB mtDNA is estimated from heteroplasmic mice by comparing the amount of NZB mtDNA in relation to total mtDNA. This is most frequently performed by PCR amplification of a mtDNA fragment encompassing a polymorphic site present in one strain, but absent in the other [5,6,9,11,16–18]. Then, based on restriction fragment length polymorphism (RFPL) analysis it is possible to discriminate between mtDNA haplotypes using an endonuclease that cuts the PCR product from one haplotype but not from the other. Although widely employed, this method (PCR-RFLP) is time consuming and the use of radioactive material in last-cycle hot PCR-RFLP [18] engenders both risk- and cost-related disadvantages [19–22].

Alternatively, heteroplasmy may be determined by real-time quantitative PCR (qPCR) based on allelic refractory mutation detection system (ARMS), as reported for point mutations present in the human mtDNA (i.e., m.3243A>G, m.8993T>G and m.8993T>C) and models of mitochondrial inheritance [13,19–26]. ARMS-qPCR is based on the work by Newton et al. [27] in which mtDNA haplotypes differing by a single nucleotide polymorphism (SNP) can be selectively amplified by qPCR [13,19–24,26]. Discrimination in ARMS-qPCR is made by an oligonucleotide with the terminal 3'-nucleotide specific to one mtDNA haplotype. Thus, amplification of the non-target haplotype will be refractory because of the presence of a mismatched 3'-residue that prevents the oligonucleotide to function as primer. Furthermore, introduction of mismatched nucleotides immediately 5' to the polymorphic site greatly increases oligonucleotide specificity allowing the quantification of heteroplasmic levels below 1% [19,20,22,24,26,27].

Herein we report the use of qPCR based on ARMS technology to quantify NZB mtDNA level from heteroplasmic cells. Using heteroplasmic mice and embryos we demonstrate the reliability of this approach in measuring heteroplasmy levels as low as 0.1%. Moreover, heteroplasmy and mtDNA copy number can be estimated from single pre-implantation embryos, without the need for preamplification. Therefore, researchers interested in investigating mitochondrial inheritance will benefit from this cost-effective approach, which enables a rapid, sensitive and accurate analysis of mtDNA haplotypes ratios in tissues and embryos from heteroplasmic mice.

## Material and Methods

All chemical and reagents used were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and all efforts were made to minimize suffering. Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> exposure and cervical dislocation. The protocol was approved by the Ethical Committee in the use of animals of the Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (protocol number 13.1.1832.74.8).

### Source of mice and embryos

Mice containing mtDNA of NZB origin were obtained by mating founder pure NZB females to B6 males and backcrossing the female progeny to B6 males for five generations [6] and thereafter maintained by brother-sister mating. Due to elimination of sperm mtDNA after at fertilization (maternal inheritance), these mice contained exclusively NZB mtDNA haplotype under a 97% B6 nuclear genome. Mice containing mtDNA of B6 origin were obtained from F<sub>1</sub> females from a cross between B6 females and males of the CBA strain. These females containing NZB or B6 mtDNA are hereafter termed NZB and B6, respectively. For zygote collection, females were superovulated by intra-peritoneal injection of 5 i.u. of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon, MSD Animal Health, Summit, USA) and 5 i.u. of human chorionic gonadotropin (hCG; Chorullon, MSD Animal Health) given 46–47 h apart [28]. After hCG injection, females were paired with F<sub>1</sub> males (derived from a cross between B6 females and CBA males) and inspected for the presence of a copulation plug at the following morning. Fertilized embryos were flushed at 18 h after hCG injection from the oviducts using HEPES-buffered KSOM medium (FHM) [28]. Zygotes were denuded of cumulus cells by pipetting in 0.3% hyaluronidase solution, washed in FHM and cultured under mineral oil in groups of 20 embryos in 40- $\mu$ l droplets of KSOM medium [28]. Embryos were cultured in humidified incubators at 37°C in air with 5% CO<sub>2</sub>. Blastocysts were obtained after 96 h of culture. Mature oocytes were collected similarly to that described to zygotes with exception that donor females were not paired with males.

### Production of heteroplasmic embryos and mice

Microsurgery was performed using an inverted microscope (Leica DMI RB; Leica, Wetzlar, Germany) equipped with micromanipulators and microinjectors (Narishige, Tokyo, Japan) based on the report by Ferreira et al [29], with few modifications. Briefly, pronuclear zygotes were placed under mineral oil in a 100- $\mu$ l droplet of FHM supplemented with 5  $\mu$ g/ml cytochalasin B and 0.5  $\mu$ g/ml nocodazole [6]. Using a 15- $\mu$ m (internal diameter) glass pipet (Eppendorf, Hamburg, Germany), a cytoplasmic biopsy of about 30% of the embryo's volume was removed from NZB zygotes and subsequently introduced into the perivitelline space of B6 zygotes from which a similar cytoplasm volume had previously been removed. The resulting couplets were placed in electrofusion solution (0.28 M mannitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM HEPES and 0.05% BSA) and exposed to a single electrical pulse of 1 kV/cm for 45  $\mu$ s (Multiporator, Eppendorf). Alternatively, NZB and B6 zygotes were incubated for 30 min in FHM supplemented with 5  $\mu$ g/ml cytochalasin B and 0.5  $\mu$ g/ml nocodazole prior to micromanipulation followed by centrifugation at 15,000 x g for 10 min. Zygote centrifugation leads to formation of a mitochondrial-enriched cytoplasmic fraction [30–32], enabling generation by cytoplasmic transfer of reconstructed zygotes with higher levels of heteroplasmy [29]. Thus, after centrifugation zygotes were subjected to the procedure of cytoplasmic transfer as described above but using the mitochondrial-enriched cytoplasmic fraction. Successfully fused

zygotes were selected and cultured to the blastocyst stage as described above. Part of the reconstructed zygotes was transferred into the oviducts of Swiss females mated to vasectomized Swiss males [28]. Anesthesia was performed by intraperitoneal injection of 100 mg/kg Ketamine (Dopalen, Ceva Santé Animale, Paulinia, Brazil) and 16 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer, São Paulo, Brazil) [28]. Females derived from cytoplasmic transfers (founders) were mated to B6 males to obtain first generation progeny (BC<sub>1</sub>). Thereafter, female progeny from each generation (BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub> and BC<sub>4</sub>) were selected based on heteroplasmic levels and backcrossed (BC) with B6 males. This heteroplasmic mouse lineage was termed B6/NZB.

### Sampling and DNA preparation

Genomic DNA (gDNA) used in qPCR reactions was extracted from tissue biopsies (tail, ear, liver, heart or brain) using a standard protocol [11,33]. Briefly, samples were incubated at 55°C for 3 h in 500 µl of a solution containing 0.4 mM NaCl, 0.02 M Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS and 0.4 mg/ml proteinase K. Protein was extracted using 25:24:1 phenol/chloroform/isoamyl alcohol and then 24:1 chloroform/isoamyl alcohol. DNA was precipitated using isopropyl alcohol, washed in 70% ethanol and eluted in ultrapure water. Samples were evaluated by UV spectroscopy at wavelengths of 260, 280 and 230 nm and aliquoted at concentration of 2.5 ng/µl of DNA.

Ear biopsies obtained using an ear punch were also prepared using an alternative protocol described by Bouma et al. [34]. According to this protocol a small biopsy of tissue (a circle of ~2 mm of diameter) was digested for 3 h at 55°C in 200 µl of a solution containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml gelatin, 0.45% Igepal CA-630, 0.45% Tween 20 and 100 µg/ml proteinase K. After digestion, samples were incubated at 95°C for 10 min for inactivation of proteinase K. Tissue lysates were then centrifuged at 10,000 x g for 5 min and 0.5 µl of the supernatant was diluted 1:100 to be used in qPCR reactions.

With respect to oocytes and embryos, these were washed three times in filtered PBS containing 0.1% polyvinyl-pyrrolidone (PVP). They were then placed individually into 0.2-ml microtubes containing 1 µl of PBS plus 0.1% PVP and stored at -20°C until further use. For use in qPCR, oocytes and embryos were digested as described above for ear biopsies by adding 4 µl of the digestion solution. However, as reported by Shitara et al. [35], the digestion solution contained 100 mg/ml proteinase K. After proteinase K inactivation, the lysate was diluted by addition of 45 µl of ultrapure water, centrifuged at 10,000 x g for 5 min and the supernatant used for analysis of heteroplasmy and mtDNA copy number.

### Analysis of mitochondrial heteroplasmy by ARMS-qPCR

Mitochondrial heteroplasmy was measured by parallel amplification of NZB and B6 mtDNA in independent reactions by qPCR based on ARMS technology [13,19,20,22,24,26,27]. Therefore, mtDNA sequences available on Genbank for NZB (L07095.1) [15] and B6 (NC\_005089.1) [14] strains were aligned allowing identification of 106 SNPs [8]. Based on this analysis and using the Primer Express software (Life Technologies, Carlsbad, USA) it was possible to design two primer pairs that amplify selectively either NZB or B6 mtDNAs (Table 1). Primers ARMS22 and MT20 were designed (S1 File) to amplify a 118-bp fragment encompassing nucleotides 3,578 to 3,695 of NZB mtDNA (part of *mt-Nd1* gene) whereas primers ARMS2 and MT14 amplify a 146-bp fragment encompassing nucleotides 3,815 to 3,960 of B6 mtDNA (part of *mt-Tq*, *mt-Tm* and *mt-Nd2* genes). qPCR reactions consisted of 15 µl containing 200 nM of each primer (ARMS22 and MT20 or ARMS2 and MT14), 1x Power SYBR Green Master Mix (Life Technologies) and 2 µl (somatic tissue) or 5 µl (oocytes or embryos) of DNA. Amplifications were performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) with

Table 1. Primer sequences used for measuring heteroplasmy and mtDNA copy number.

Target	Primer	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Product (bp)
mtDNA <sup>b</sup>	MT12	CGCCCTAACAACTATTATCTTCC	736
	MT13	GACCGTTTGTGTTGTTGAAA	
mtDNA <sup>b</sup>	MT14	CTCCGTGCTACCTAACACCTTATC	148
	MT15	GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG	
B6 mtDNA <sup>c</sup>	MT14	CTCCGTGCTACCTAACACCTTATC	146
	ARMS2	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG <u>C</u>	
NZZ mtDNA <sup>d</sup>	MT20	TGGCACTCCCGCTGTAATAA	118
	ARMS22	TTATCCACGCTTCCGTTACG <u>C</u>	
<i>Apob</i> (nuclear DNA)	OIMR1544	CACGTGGGCTCCAGCATT	74
	OIMR3580	TCACCAGTCATTTCTGCCTTG	

<sup>a</sup>Underlined nucleotides are complementary to one of mtDNA haplotypes (NZZ or B6) due to the presence of a polymorphic nucleotide at position 3,599 (ARMS22) and 3,932 (ARMS2), respectively. A mismatched nucleotide introduced immediately 5' to the polymorphic sites is represented in lowercase.

<sup>b</sup>Non-discriminative assays that amplify mtDNA of B6 and NZZ origin.

<sup>c</sup>Discriminative assay that amplifies mtDNA of B6 origin.

<sup>d</sup>Discriminative assay that amplifies mtDNA of NZZ origin.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.t001

the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 62°C for 1 min. SYBR Green fluorescence was measured at the end of each extension step (62°C). Specificity of the amplified fragments was confirmed by melt-curve analysis and electrophoresis of the PCR products on 2% agarose gel. Samples were analyzed in duplicates or triplicates and averaged for calculation of heteroplasmy. Standard curves were generated by qPCR using as template 5-fold serial dilutions of heteroplasmic DNA (25, 5, 1 and 0.2 ng per reaction). As suggested by the manufacturer, a first-degree linear regression was fitted for the log of input amount of template versus the Ct (cycle threshold) and the delta ( $\Delta$ ) Ct values for serial-diluted DNAs [36]. The  $\Delta$ Ct was calculated by subtracting Ct<sub>B6</sub> values from Ct<sub>NZZ</sub> values. Amplification efficiency for each primer pair was estimated based on the slope values from the linear regression (log of DNA vs. Ct values) as follows: efficiency =  $10^{(-1/\text{slope})}$ . On the other hand, amplification efficiency was compared between B6 and NZZ assays based on the slope values from other linear regression (log of DNA vs.  $\Delta$ Ct values). In the latter case, if the slope values are equal or smaller than 0.1, the level of NZZ mtDNA can be estimated in relation to the sum of NZZ and B6 mtDNA [36].

### Quantification of mtDNA copy number

The number of mtDNA copies was estimated in oocytes and whole embryos based on a previous report [9]. Briefly, using primers MT12 and MT13 a 736-bp fragment encompassing nucleotides 3,455 to 4,190 of both B6 and NZZ mtDNAs was amplified and cloned into a pCR2.1-TopoTA (Life Technologies). Based on UV spectroscopy, the resulting plasmid DNA (pDNA) was aliquoted at concentration of  $0.2 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l and kept at -80°C until use. For quantification of mtDNA copy number a standard curve was prepared by dilution of the pDNA to  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  and  $10^3$  copies per reaction. This standard curve was amplified in parallel with samples containing 10% of embryo lysate (5  $\mu$ l from a total of 50  $\mu$ l of lysate). Amplification was performed as described for quantification of heteroplasmy, but using primers MT14 and MT15 (Table 1). These non-discriminative primers amplify a 148-bp fragment encompassing nucleotides 3,815 to 3,962 of NZZ and B6 mtDNA (part of *mt-Tq*, *mt-Tm* and

*mt-Nd2* genes). Based on the standard curve values, it was possible to estimate mtDNA copy number in each sample using the 7500 Software (v. 2.0.6; Life Technologies).

The number of mtDNA copies per cell was determined in somatic tissues by normalization of mtDNA amount against a single copy nuclear gene (*Apob*) [37]. Primers MT14 and MT15 were used to amplify mtDNA whereas primers OIMR1544 and OIMR3580 were used to amplify a 74-bp fragment from *Apob* gene (Table 1). Both reactions were performed in parallel and following the amplification conditions described above. The amplification efficiency of mtDNA and *Apob* assays was analyzed as described above (see item 2.4.). The number of mtDNA copies per cell was then determined as reported by Nicklas et al. [37].

### Statistics

Statistical analyses were performed using the SAS System (v. 9.3; Cary, USA). All data were tested for assumption of normal distribution and homogeneity of variance. When needed, data were transformed (log or square root) to meet these criteria. Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) was used for analysis of the relationship between two variables. The level of NZB mtDNA in embryos was analyzed by two-way ANOVA considering two developmental stages (zygote and blastocyst) and two experimental groups (centrifuged and non-centrifuged embryos). Remaining data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. Differences with probabilities ( $P$ ) < 0.05 were considered significant. Values are reported as mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). In some instances, the coefficient of variance (CV) is also reported.

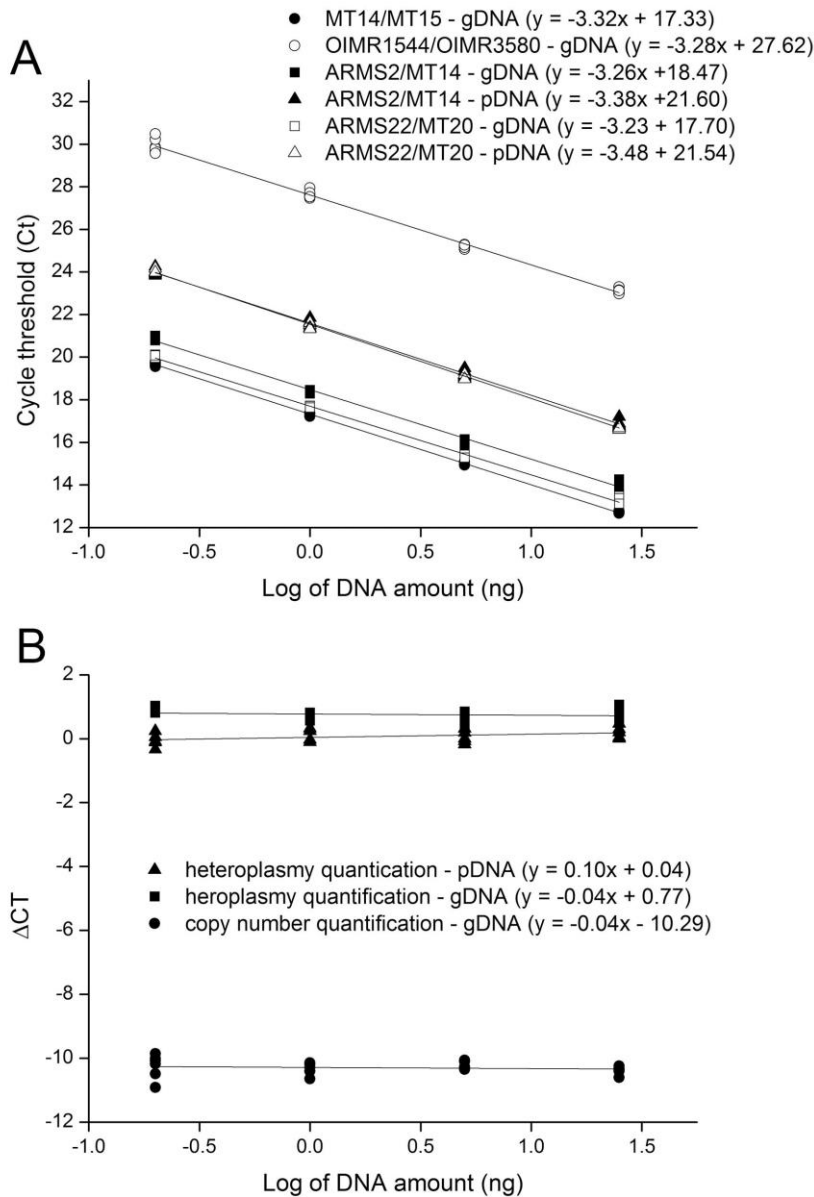
### Results

#### Reliability of the assay for quantification of heteroplasmy

At first, we sought to investigate whether primers designed based on ARMS technology could be used for quantification of heteroplasmy by qPCR. Comparison of the assays used for amplification of mtDNA of NZB and B6 origin (Table 1) showed that both primer pairs have high (>93%) and similar (slope  $\leq$  0.1) efficiency of amplification (Fig 1). Quantification of heteroplasmy using these primers also proved to be efficient, with sensitivity to detect as low as 0.1% of either NZB or B6 mtDNA (Fig 2). Non-specific amplification of non-target mtDNA (i.e., NZB mtDNA) accounted for only 0.01% of target amplification when a homoplasmic sample (i.e., B6 mtDNA) was used (Fig 2). Even when different proportions of gDNA from NZB and B6 homoplasmic mice were mixed, the assay was capable of estimating the percentage of NZB mtDNA with great efficiency (Fig 3). Regardless of the use of 5.0 or 0.5 ng of DNA per reaction, a very consistent relationship ( $r = 0.99$ ;  $P < 0.0001$ ) was found between the input level of NZB gDNA and the level of NZB mtDNA estimated by qPCR (Fig 3). Furthermore, the CV of the intra-run and inter-run were equal to  $4.6\% \pm 1.33$  and  $2.7\% \pm 0.86$ , respectively, when comparing the level of NZB mtDNA among triplicates. In summary, these results gave evidence of the efficiency and sensitivity of the approach, which supports its use for measurement of NZB mtDNA level in heteroplasmic mouse samples.

#### Analysis of heteroplasmy in germline and somatic tissues

Next, we aimed at confirming the reliability of ARMS-qPCR assay by measuring the level of NZB mtDNA in embryos produced by two methods based on cytoplasmic transfer (Fig 4). According to our measurements, zygotes from the centrifuged group contained  $34.0\% \pm 3.76$  (range, 15.7–56.6) of NZB mtDNA in comparison to  $21.1\% \pm 3.76$  (range, 10.7–50.2) present in zygotes from the non-centrifuged group (Fig 4). Culture of heteroplasmic embryos to the



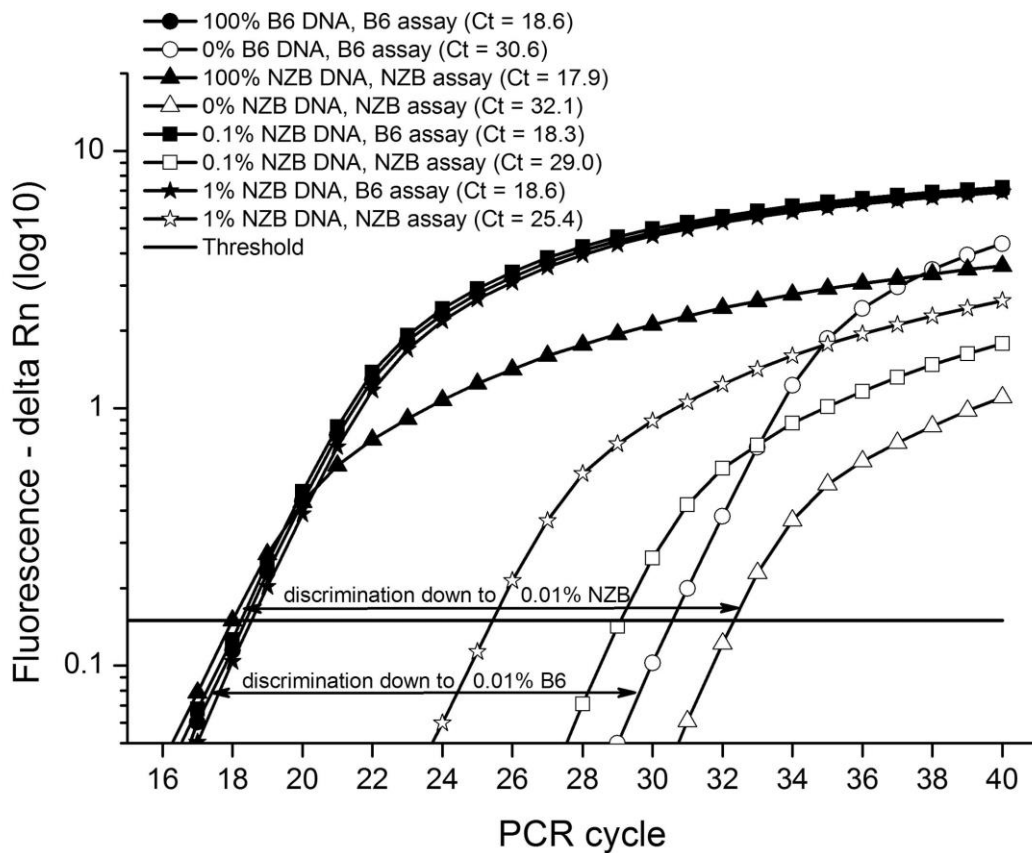
**Fig 1. Analysis of primer efficiency.** Standard curves were generated by qPCR using as template 5-fold serial dilutions of heteroplasmic gDNA or pDNA (25, 5, 1 and 0.2 ng per reaction). First-degree linear regressions were fitted for the log of input amount of template versus the Ct (A) or the  $\Delta Ct$  (B) values for serial-diluted DNAs. The  $\Delta Ct$  was calculated by subtracting either  $Ct_{B6}$  from  $Ct_{NZB}$  (heteroplasmy quantification) or  $Ct_{mtDNA}$  from  $Ct_{Apob}$  (copy number

quantification). Comparison of amplification efficiency between primer pairs (ARMS2/MT14 vs. ARMS22/MT20 and MT14/MT15 vs. OIMR1544/OIMR3580) was found similar as the slope values from linear regressions were equal or smaller than 0.1 (B). Moreover, the use of gDNA or pDNA for heteroplasmy quantification did not affect slope values.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g001

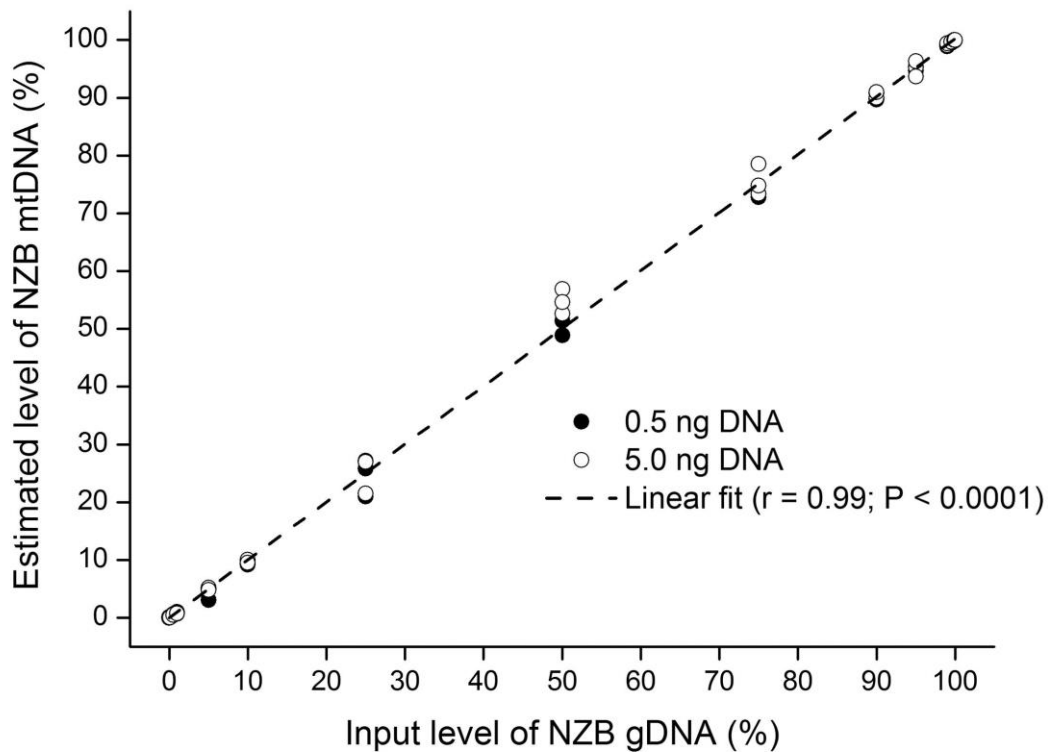
blastocyst stage confirmed these findings (Fig 4) as blastocysts from the centrifuged group contained  $39.9\% \pm 2.54$  (range, 15.1–60.7) of NZB mtDNA whereas blastocysts from the non-centrifuged group contained  $19.2\% \pm 3.76$  (range, 4.3–41.9). Thus, consistent with our previous report [29], embryos from the centrifuged group contained, regardless of the developmental stage ( $P < 0.0001$ ), more NZB mtDNA than non-centrifuged embryos.

In order to validate the ARMS-qPCR assay in somatic tissues, heteroplasmic zygotes from the centrifuged group were transferred to foster mothers that gave birth to 14 heteroplasmic



**Fig 2. Specificity of the ARMS-qPCR approach for amplification of target mtDNA.** Using samples from homoplasmic mice (either NZB or B6), non-specific amplification of non-target mtDNA accounted for only 0.01% of target amplification. Analysis of samples from heteroplasmic mice showed that levels as low as 0.1% of mtDNA of NZB or B6 origin could be detected. Individual Ct values (cycle at which plots crossed the threshold) are denoted in the inset.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g002

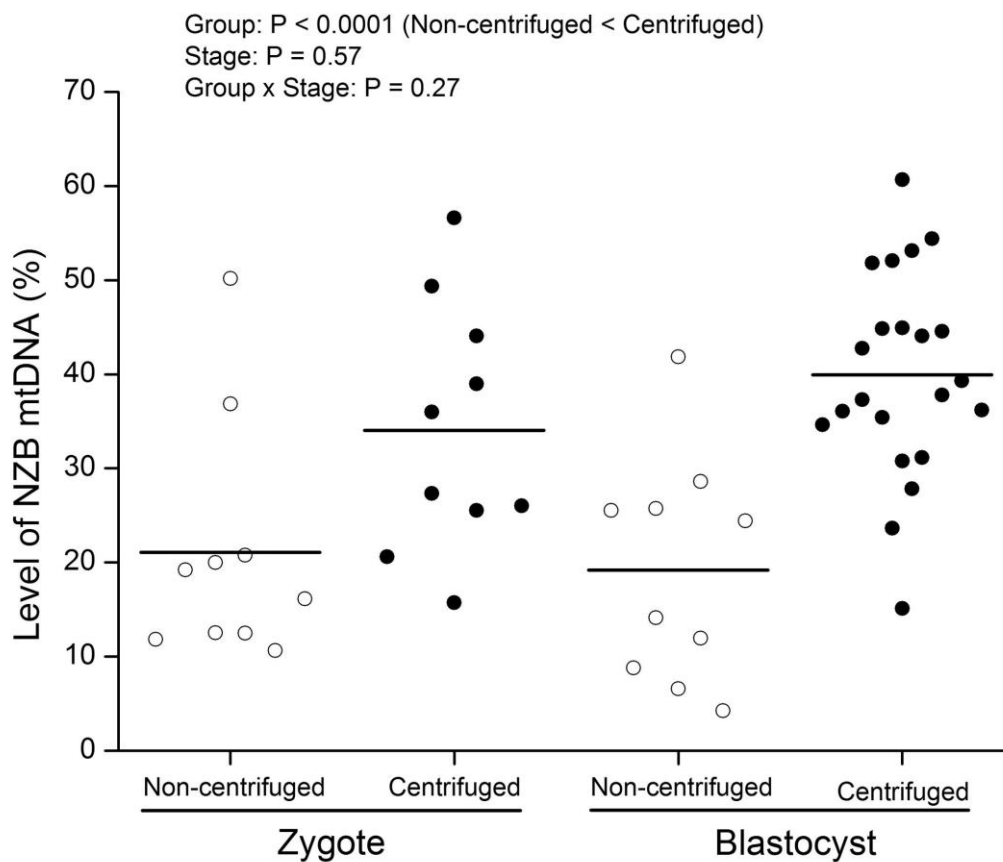


**Fig 3. Relationship between the input level of NZB gDNA and the level of NZB mtDNA estimated by ARMS-qPCR.** Different proportions of gDNA from NZB mice (100%, 99.9%, 99.5%, 99%, 95%, 90%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1% and 0%) were mixed with gDNA from B6 mice to be analyzed by ARMS-qPCR. Filled circles depict the use of 0.5 ng of DNA per reaction (duplicates) whereas empty circles depict the use of 5.0 ng of DNA (triplicates). The relationship between the input level of NZB gDNA and the level of NZB mtDNA determined by ARMS-qPCR was analyzed by calculating Pearson's correlation coefficient ( $r$ ).  $P$  value is denoted in the inset.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g003

pups (Fig 5). These founder mice contained on average  $42.8\% \pm 3.92$  (range, 13.0–65.6) of NZB mtDNA in tail, which did not differ ( $P > 0.05$ ) from the level found in zygotes of the same experimental group (Fig 4). However, the level of NZB mtDNA in founders differed in tail ( $P < 0.05$ ) between males ( $49.6\% \pm 4.72$ ) and females ( $33.7\% \pm 5.45$ ). Moreover, analysis of five heteroplasmic males aged four months provided evidence that the level of NZB mtDNA is variable among tissues (Fig 6). These males contained more NZB mtDNA ( $P = 0.004$ ) in liver ( $83.0\% \pm 5.08$ ) than in tail ( $55.3\% \pm 5.08$ ), heart ( $58.0\% \pm 5.08$ ) or brain ( $58.2\% \pm 5.08$ ). With respect to founder females, these were mated with B6 males to obtain BC<sub>1</sub> generation. Females from BC<sub>1</sub> generation contained on average  $33.7\% \pm 7.32$  (range, 0.8–81.3) of NZB mtDNA, which did not differ from founder females ( $P > 0.05$ ). To establish a heteroplasmic mouse lineage, three females from BC<sub>1</sub> and their progeny were backcrossed for four generations with B6 males (Fig 5). The use of progenitors with intermediate levels of heteroplasmy resulted in females from BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub> and BC<sub>5</sub> generations with  $69.7\% \pm 4.45$  (range, 41.9–91.9),

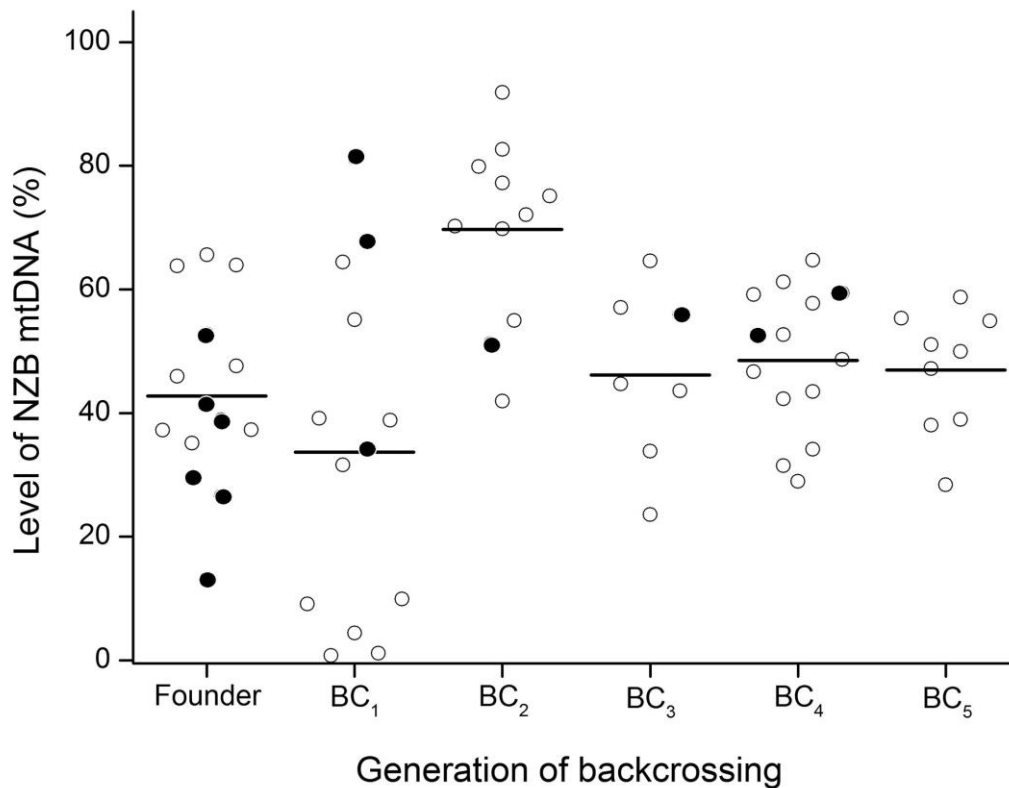




**Fig 4. Level of NZB mtDNA in heteroplasmic mouse embryos produced by cytoplasmic transfer.** Zygotes were centrifuged prior to cytoplasmic transfer to enable production of embryos with higher levels of NZB mtDNA (filled circles). For comparison, cytoplasmic transfer was also performed without centrifugation (empty circles). Embryos from both groups were evaluated with regards to the level of NZB mtDNA at the zygote and blastocyst stages by ARMS-qPCR. Bars represent the means. P values for the effect of Group, Stage and Group x Stage are denoted in the inset.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g004

46.2%  $\pm$  5.00 (range, 23.6–64.6), 48.5%  $\pm$  3.18 (range, 29.0–64.7) and 47.0%  $\pm$  3.12 (range, 28.4–58.7) of NZB mtDNA, respectively. Three females from BC<sub>4</sub> generation containing 31.5%, 46.7% and 59.2% of NZB mtDNA also had heteroplasmy measured in their oocytes, which contained, respectively, 22.4%  $\pm$  2.33 (range, 7.9–32.9), 41.9%  $\pm$  3.59 (range, 23.3–53.5) and 48.2%  $\pm$  7.28 (range, 21.7–65.4) of NZB mtDNA. Altogether, these results demonstrated the efficacy of the ARMS-qPCR assay for measurement of heteroplasmy, supporting its use in this mouse model.

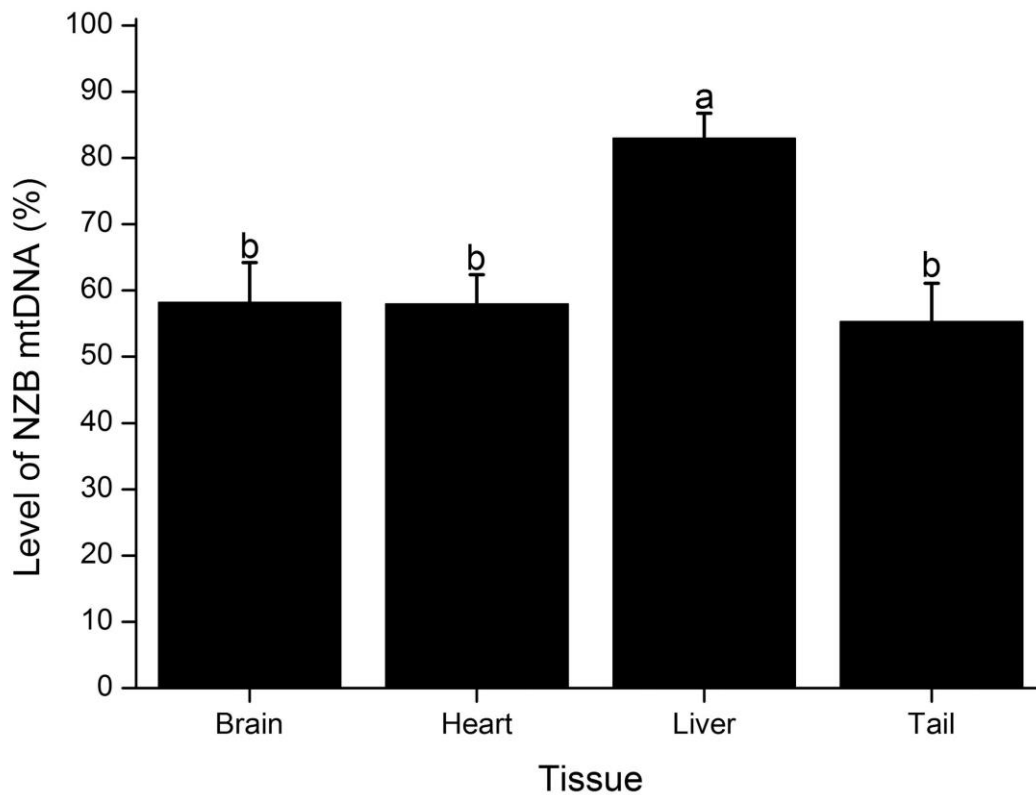


**Fig 5. Level of NZB mtDNA across generations in a heteroplasmic mouse lineage produced by cytoplasmic transfer.** Circles depict the level of NZB mtDNA in mice estimated by ARMS-qPCR from ear biopsies. Filled circles depict females that were backcrossed (BC) with B6 males to obtain the next generation progeny (BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub> and BC<sub>5</sub>). The level of NZB mtDNA was not determined for males, except in the founder lineage where males are depicted by empty circles. In the remaining generations (BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub> and BC<sub>5</sub>) empty circles depict females that were not mated. Bars represent the means.

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g005

#### Analysis of mtDNA copy number in germline and somatic tissues

As analysis of heteroplasmy is commonly accompanied by estimation of mtDNA copy number, we designed primers that non-discriminatively amplify mtDNA of NZB and B6 origin. These primers were used in conjunction with primers that amplify a single copy nuclear gene (*ApoB*) to measure mtDNA copy number in somatic tissues. However, we first compared amplification efficiency of these primer pairs (Fig 1) to demonstrate they were high (~100%) and similar (slope  $\leq 0.1$ ). Then, using the five heteroplasmic males described above we found that mtDNA copy number (Fig 7) is greater ( $P < 0.0001$ ) in brain ( $3,066.4 \pm 373.58$ ; 2,335.0–4469.4) and heart ( $3,579.9 \pm 375.55$ ; 2470.5–4804.9) than in liver ( $1,326.8 \pm 255.53$ ; 660.9–2,236.8) and tail ( $126.8 \pm 58.14$ ; 24.5–225.8). Liver also contained more mtDNA copies than tail ( $P < 0.0001$ ). This non-discriminative assay was also used to measure mtDNA in single oocytes. In this case, the single copy nuclear gene was not necessary as mtDNA copy number was estimated in



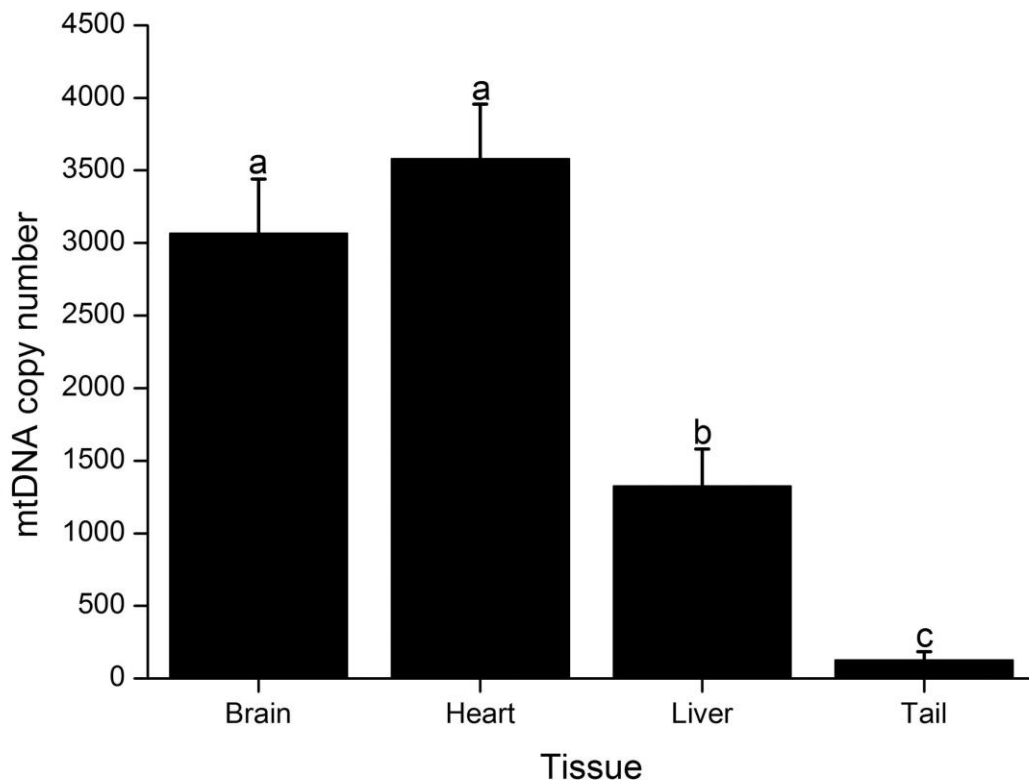
**Fig 6. Comparison of the level of NZB mtDNA among tissues of heteroplasmic males.** Bars depict the level of NZB mtDNA estimated by ARMS-qPCR from mice aged four months. Tissues analyzed included brain, heart, liver and tail. Values are reported as mean  $\pm$  SEM. Bars with different letters denote a significant difference among tissues ( $P < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g006

relation to an external control. Analysis of heteroplasmic oocytes from three  $BC_4$  females indicated that these contained  $344,738 \pm 11,981$  (range, 179,185–477,175) copies of mtDNA. In summary, these results support the use of our ARMS-qPCR assay for a rapid, sensitive and reliable quantification of mtDNA copy number and heteroplasmy in a mouse model with mtDNA of NZB and B6 origin.

### Discussion

Herein we report the use of ARMS-qPCR for quantification of heteroplasmy in a mouse model widely used in mitochondrial inheritance studies [5–13]. Our approach enables single-step quantification of heteroplasmy (i.e., quantification of either NZB or B6 mtDNA haplotypes), with sensitivity to detect as low as 0.1% of target mtDNA. Whereas quantification of heteroplasmy by PCR-RFLP takes several hours to be concluded (including PCR, labeling, restriction enzyme digestion, electrophoresis and analysis of signal intensity), analysis by ARMS-qPCR is



**Fig 7. Comparison of mtDNA copy number among tissues of heteroplasmic males.** Bars depict mtDNA copy number per cell from mice aged four months. Tissues analyzed included brain, heart, liver and tail. Values are reported as mean  $\pm$  SEM. Bars with different letters denote a significant difference among tissues ( $P < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0133650.g007

completed within two hours as PCR, signal recording and analysis are all performed in a single step [13,19–23,25,26]. Moreover, although alternative labeling methods are available, radioactive labeling is still employed in last-cycle hot PCR-RFLP to avoid detection of heteroduplexes [18]. Therefore, the ARMS-qPCR approach represents a more powerful strategy for quantification of heteroplasmy.

Initially, as reported by others [13,20,22–24,29,38], we performed quantification of heteroplasmy by employing a discriminative (targeting B6 mtDNA) and a non-discriminative (targeting both NZB and B6 mtDNAs) assay. As a consequence, quantification accuracy was lower in samples with over 50% of NZB mtDNA (data not shown). The use of a discriminative assay targeting NZB mtDNA instead of the non-discriminative assay solved the problem, allowing measures of either NZB or B6 mtDNA haplotype from 0.1% to 99.9%, with high accuracy. Yet, a distinct SNP from the one targeted by the B6 assay (m.3932G>A) had to be utilized for the NZB assay (m.3599T>C). This was necessary as the presence of an adenine at position 3,599 of NZB mtDNA prevented the use of an ARMS assay with high specificity to amplify NZB

mtDNA. On the other hand, the presence of a cytosine at position 3,932 of NZB mtDNA allowed the use of another ARMS assay capable of discriminating as little as 0.01% of NZB mtDNA, as in the case for the B6 assay. Moreover, the use of SYBR Green in qPCR provided a higher detection signal compared to the use of TaqMan probes (data not shown). Thus, considering the need to perform single cell quantification of heteroplasmy, the use of SYBR Green, besides being cost-effective, improved the assay sensitivity.

To validate our ARMS-qPCR approach, heteroplasmic zygotes were produced by cytoplasmic transfer using two methods that enable production of embryos with distinct levels of heteroplasmy [29]. According to our findings, embryos from the centrifuged group contained more NZB mtDNA than embryos from the non-centrifuged group. This result can be explained as centrifugation leads to formation of a mitochondrial-enriched cytoplasmic fraction [30–32] that can be removed from NZB embryos and transferred to B6 embryos from which the same cytoplasmic fraction was previously removed [29]. Hence, the use of centrifuged embryos enables generation of embryos with higher levels of heteroplasmy [29], which is in line with our present measurements. Transfer of zygotes from the centrifuged group to foster mothers enabled production of 14 mice, which contained on average  $42.8\% \pm 3.92$  of NZB mtDNA. As previously reported [5,8,10,13], the level of NZB mtDNA was expected to remain constant in tail, brain and heart while they increase with age in the liver. Analysis of NZB mtDNA haplotype from heteroplasmic males confirmed these previous findings, providing evidence of the reliability of our approach. Further evidence of this was provided by the finding that the level of NZB mtDNA was similar between heteroplasmic females and their oocytes or progenies, which is fully consistent with a random-drift model of mtDNA segregation [2,6,7,11].

At last, the number of mtDNA copies was measured in germline and somatic tissues using a non-discriminative assay. In oocytes, mtDNA copy number was estimated based on an external control, whereas in somatic tissues it was estimated in relation to a single copy nuclear gene. Estimation from both oocytes and somatic tissues provided results similar to those described in the literature [2,9,11,39–41]. As these assays for mtDNA copy number quantification were optimized for use under the same conditions as the assays for heteroplasmy quantification, both estimations can be performed in parallel providing a rapid and sensitive analysis.

In conclusion, based on the use of ARMS technology we report a qPCR assay for single-step quantification of heteroplasmy and mtDNA copy number from mice with mtDNA haplotype of NZB and B6 origin. This ARMS-qPCR assay was shown to be rapid, sensitive and accurate, enabling quantification of heteroplasmy from germline and somatic tissues to a limit of 0.1%. These findings are relevant as our ARMS-qPCR approach is fully compatible with similar heteroplasmic mouse models used previously to study mitochondrial inheritance in mammals [5–12].

## Supporting Information

**S1 File. ARMS-qPCR strategy.** The scheme illustrates the rationale involving ARMS-qPCR technology.  
(DOC)

**S2 File. Relationship between the input level of NZB gDNA and the level of NZB mtDNA estimated by ARMS-qPCR.** Different proportions of gDNA from NZB mice (100%, 99.9%, 99.5%, 99%, 95%, 90%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1% and 0%) were mixed with gDNA from B6 mice (input NZB%) to be analyzed by ARMS-qPCR (estimated NZB%).  
(XLSX)

**S3 File. Level of NZB mtDNA in heteroplasmic mouse embryos produced by cytoplasmic transfer.** Zygotes were centrifuged prior to cytoplasmic transfer to enable production of embryos with higher levels of NZB mtDNA. For comparison, cytoplasmic transfer was also performed without centrifugation. Embryos from both groups were evaluated with regards to the level of NZB mtDNA at the zygote and blastocyst stages by ARMS-qPCR. (XLSX)

**S4 File. Comparison of the level of NZB mtDNA among tissues of heteroplasmic males.** The level of NZB mtDNA was estimated by ARMS-qPCR from mice aged four months. Tissues analyzed included brain, heart, liver and tail. (XLSX)

**S5 File. Level of NZB mtDNA across generations in a heteroplasmic mouse lineage produced by cytoplasmic transfer.** The level of NZB mtDNA was estimated by ARMS-qPCR from ear biopsies. Females were backcrossed (BC) with B6 males for five generations to obtain the next generation progeny (BC<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>, BC<sub>4</sub> and BC<sub>5</sub>). The level of NZB mtDNA was not determined for males, except in the founder lineage. (XLSX)

**S6 File. Comparison of mtDNA copy number among tissues of heteroplasmic males.** The number of mtDNA copies per cell was estimated from mice aged four months. Tissues analyzed included brain, heart, liver and tail. (XLSX)

## Acknowledgments

The authors thank Professor Joanna Poulton from University of Oxford for her critical reading of this manuscript and comments.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FVM MRC. Performed the experiments: TSM CHM JRS TBR MRC. Analyzed the data: LCS MRC. Contributed reagents/materials/analysis tools: FVM MRC. Wrote the paper: LCS MRC.

## References

- Mishra P, Chan DC (2014) Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 634–646. doi: [10.1038/nrm3877](https://doi.org/10.1038/nrm3877) PMID: [25237825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25237825/)
- Wallace DC, Chalkia D (2013) Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a021220. doi: [10.1101/cshperspect.a021220](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220) PMID: [24186072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24186072/)
- Cree LM, Samuels DC, Chinnery PF (2009) The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim Biophys Acta* 1792: 1097–1102. doi: [10.1016/j.bbadis.2009.03.002](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.03.002) PMID: [19303927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19303927/)
- Stewart JB, Larsson N-G (2014) Keeping mtDNA in shape between generations. *PLoS Genet* 10: e1004670. doi: [10.1371/journal.pgen.1004670](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004670) PMID: [25299061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25299061/)
- Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, et al. (2012) Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* 151: 333–343. doi: [10.1016/j.cell.2012.09.004](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.004) PMID: [23063123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23063123/)
- Meirelles F V, Smith LC (1997) Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics* 145: 445–451. PMID: [9071597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9071597/)
- Jenuth J, Peterson A, Fu K, Shoubridge E (1996) Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregations of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 14: 146–151. PMID: [8841183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8841183/)
- Jenuth J, Peterson A, Shoubridge E (1997) Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 16: 93–95. PMID: [9140402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9140402/)

9. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA (2008) The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 40: 1484–1488. doi: [10.1038/ng.258](https://doi.org/10.1038/ng.258) PMID: [19029901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029901/)
10. Battersby BJ, Loredó-Osti JC, Shoubridge EA (2003) Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat Genet* 33: 183–186. doi: [10.1038/ng1073](https://doi.org/10.1038/ng1073) PMID: [12539044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12539044/)
11. Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, et al. (2008) A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 40: 249–254. doi: [10.1038/ng.2007.63](https://doi.org/10.1038/ng.2007.63) PMID: [18223651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18223651/)
12. Jokinen R, Martinen P, Sandell HK, Manninen T, Teerenhovi H, Wai T, et al. (2010) Gimap3 regulates tissue-specific mitochondrial DNA segregation. *PLoS Genet* 6: e1001161. doi: [10.1371/journal.pgen.1001161](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001161) PMID: [20976251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20976251/)
13. Burgstaller JP, Johnston IG, Jones NS, Albrechtová J, Kolbe T, Vogl C, et al. (2014) MtDNA Segregation in Heteroplasmic Tissues Is Common InVivo and Modulated by Haplotype Differences and Developmental Stage. *Cell Rep* 7: 2031–2041. doi: [10.1016/j.celrep.2014.05.020](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.020) PMID: [24910436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24910436/)
14. Bayona-Bafaluy MP, Acín-Pérez R, Mullikin JC, Park JS, Moreno-Loshuertos R, Hu P, et al. (2003) Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 31: 5349–5355. PMID: [12954771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12954771/)
15. Loveland B, Wang C, Yonekawa H, Hermel E, Lindahl K (1990) Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* 60: 971–980. PMID: [2317868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2317868/)
16. Battersby BJ, Redpath ME, Shoubridge EA (2005) Mitochondrial DNA segregation in hematopoietic lineages does not depend on MHC presentation of mitochondrially encoded peptides. *Hum Mol Genet* 14: 2587–2594. doi: [10.1093/hmg/ddi293](https://doi.org/10.1093/hmg/ddi293) PMID: [16049030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049030/)
17. Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, Shoubridge EA, Moraes CT (2005) Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14392–14397. doi: [10.1073/pnas.0502896102](https://doi.org/10.1073/pnas.0502896102) PMID: [16179392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16179392/)
18. Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, Schon EA (1992) The Mitochondrial tRNA<sup>LeU</sup> (UUR) Mutation in Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes (MELAS): Genetic, Biochemical, and Morphological Correlations in Skeletal Muscle. *Am J Hum Genet* 50: 934–949. PMID: [1315123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1315123/)
19. Wang J, Venegas V, Li F, Wong L-J (2011) Analysis of mitochondrial DNA point mutation heteroplasmy by ARMS quantitative PCR. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 19: Unit 19.6. doi: [10.1002/0471142905.hg1906s68](https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1906s68)
20. Lee H-S, Ma H, Juanes RC, Tachibana M, Sparman M, Woodward J, et al. (2012) Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. *Cell Rep* 1: 506–515. doi: [10.1016/j.celrep.2012.03.011](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.011) PMID: [22701816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22701816/)
21. Bai R-K, Wong L-JC (2004) Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. *Clin Chem* 50: 996–1001. doi: [10.1373/clinchem.2004.031153](https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031153) PMID: [15073091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15073091/)
22. Burgstaller JP, Schinogl P, Dinnyes A, Müller M, Steinborn R (2007) Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev Biol* 7: 141. doi: [10.1186/1471-213X-7-141](https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-141) PMID: [18154666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154666/)
23. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H, et al. (2012) Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 493: 627–631. doi: [10.1038/nature11647](https://doi.org/10.1038/nature11647) PMID: [23103867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23103867/)
24. Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, Achmann R, Scherthner W, Stojkovic M, et al. (2000) Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet* 25: 255–257. doi: [10.1038/77000](https://doi.org/10.1038/77000) PMID: [10888867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10888867/)
25. Venegas V, Halberg MC (2012) Quantification of mtDNA mutation heteroplasmy (ARMS qPCR). *Methods Mol Biol* 837: 313–326. doi: [10.1007/978-1-61779-504-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-504-6_21) PMID: [22215557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22215557/)
26. Biffi S, Bortot B, Carrozzi M, Severini GM (2011) Quantification of heteroplasmic mitochondrial DNA mutations for DNA samples in the low picogram range by nested real-time ARMS-qPCR. *Diagn Mol Pathol* 20: 117–122. doi: [10.1097/PDM.0b013e3181efe2c6](https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181efe2c6) PMID: [21532488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21532488/)
27. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503–2516. PMID: [2785681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2785681/)
28. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 764 p.

29. Ferreira CR, Burgstaller JP, Perecin F, Garcia JM, Chiaratti MR, Méo SC, et al. (2010) Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. *Biol Reprod* 82: 563–571. doi: [10.1095/biolreprod.109.080564](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080564) PMID: [19955333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19955333/)
30. Nakamura K, Tsunoda Y, Nagai T, Sugie T (1986) Effect of centrifugation of mouse eggs on their development in vitro and in vivo. *Gamete Res* 15: 83–86. doi: [10.1002/mrd.1120150109](https://doi.org/10.1002/mrd.1120150109)
31. Tatham BG, Sathananthan AH, Dharmawardena V, Munasinghe DY, Lewis I, Trounson AO (1996) Fertilization and early embryology: Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. *Hum Reprod* 11: 1499–1503. doi: [10.1093/oxfordjournals.humrep.a019425](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019425) PMID: [8671492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8671492/)
32. Cran DG (1987) The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. *Gamete Res* 18: 67–76. doi: [10.1002/mrd.1120180108](https://doi.org/10.1002/mrd.1120180108) PMID: [3507363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3507363/)
33. Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2028 p.
34. Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM (2004) Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 5: 141–149. doi: [10.1016/j.modgep.2004.05.001](https://doi.org/10.1016/j.modgep.2004.05.001) PMID: [15533830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15533830/)
35. Shitara H, Kaneda H, Sato A, Inoue K, Ogura A, Yonekawa H et al. (2000) Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156: 1277–1284. doi: [10.1073/pnas.1303231110](https://doi.org/10.1073/pnas.1303231110) PMID: [11063701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11063701/)
36. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408.
37. Nicklas JA, Brooks EM, Hunter TC, Single R, Branda RF (2004) Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat. *Environ Mol Mutagen* 44: 313–320. doi: [10.1002/em.20050](https://doi.org/10.1002/em.20050) PMID: [15476199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15476199/)
38. Chiaratti MR, Ferreira CR, Perecin F, Méo SC, Sangalli JR, Mesquita LG, et al. (2011) Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. *Reprod Biomed Online* 22: 172–183. doi: [10.1016/j.rbmo.2010.10.011](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.10.011) PMID: [21196133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21196133/)
39. Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, et al. (2007) The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 39: 386–390. doi: [10.1038/ng1970](https://doi.org/10.1038/ng1970) PMID: [17293866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17293866/)
40. May-Panloup P, Chretien M-F, Malhiery Y, Reynier P (2007) Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 77: 51–83. doi: [10.1016/S0070-2153\(06\)77003-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77003-X) PMID: [17222700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17222700/)
41. Aiken CE, Cindrova-Davies T, Johnson MH (2008) Variations in mouse mitochondrial DNA copy number from fertilization to birth are associated with oxidative stress. *Reprod Biomed Online* 17: 806–813. doi: [10.1016/S1472-6483\(10\)60409-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60409-9) PMID: [19079965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079965/)



ANEXO 2. Reprodução autorizada pela Animal Reproduction do manuscrito intitulado “Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission” publicado no periódico Animal Reproduction.

DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0069



Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, August 16th to 18th, 2018.

### Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission

Marcos R. Chiaratti<sup>1,2,6</sup>, Bruna M. Garcia<sup>1</sup>, Karen F. Carvalho<sup>1</sup>, Carolina H. Macabelli<sup>1</sup>, Fernanda Karina da Silva Ribeiro<sup>1</sup>, Amanda F. Zangirolamo<sup>3</sup>, Fabiana D. Sarapião<sup>3</sup>, Marcelo M. Seneda<sup>3</sup>, Flávio V. Meirelles<sup>2,4</sup>, Francisco E. G. Guimarães<sup>5</sup>, Thiago S. Machado<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>4</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

#### Abstract

Oocyte mitochondria are increased in number, smaller, and rounder in appearance than mitochondria in somatic cells. Moreover, mitochondrial numbers and activity are narrowly tied with oocyte quality because of the key role of mitochondria to oocyte maturation. During oocyte maturation, mitochondria display great mobility and cluster at specific sites to meet the high energy demand. Conversely, oocyte mitochondria are not required during early oogenesis as coupling with granulosa cells is sufficient to support gamete's needs. In part, this might be explained by the importance of protecting mitochondria from oxidative damage that result in mutations in mitochondrial DNA (mtDNA). Considering mitochondria are transmitted exclusively by the mother, oocytes with mtDNA mutations may lead to diseases in offspring. Thus, to counterbalance mutation expansion, the oocyte has developed specific mechanisms to filter out deleterious mtDNA molecules. Herein, we discuss the role of mitochondria on oocyte developmental potential and recent evidence supporting a purifying filter against deleterious mtDNA mutations in oocytes.

**Keywords:** dynamics, fertility, mitochondria, mtDNA, oocyte.

#### Introduction

Mitochondrial architecture is significantly different in germ than in somatic cells, characterizing in oocytes by its rounder appearance and fragmented network. In addition, a large number of mitochondria is present in oocytes, suggesting they play a key role in the gamete (Wassarman and Josefowicz, 1978; Jansen and De Boer, 1998; Motta *et al.*, 2000). In keeping with this, abnormal mitochondrial numbers, distribution and functionality have been associated with poor quality oocytes in humans, mice, sheep, cows and pigs. For instance, a minimum of mitochondrial DNA (mtDNA) copies in mammalian oocytes seems to be required for fertilization (Reynier *et al.*, 2001; Tarin *et al.*, 2001; May-Panloup *et al.*, 2005; El Shourbagy *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Wai *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). In addition, prepubertal oocytes from sheep, cows and pigs, which present poor developmental rates compared to adult counterparts,

have altered mitochondrial distribution and decreased mtDNA copy number (O'Brien *et al.*, 1996; de Paz *et al.*, 2001; Reader *et al.*, 2015a, b). Besides, supplementation of poor quality human and bovine oocytes with cytoplasm or isolated mitochondria have been shown to increase their developmental potential (Cohen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999; Lanzendorf *et al.*, 1999; Dale *et al.*, 2001; Hua *et al.*, 2007; Chiaratti *et al.*, 2011; Oktay *et al.*, 2015).

Apart from affecting oocyte quality, mitochondrial dysfunctions originating from mutations in mtDNA may be transmitted to following generations and cause diseases in humans (Schon *et al.*, 2012; Stewart and Chinnery, 2015). The high levels of reactive oxygen species (ROS) generated in mitochondria make mtDNA high susceptible to oxidative damage (Wallace and Chalkia, 2013). Yet, given that mitochondria are inherited exclusively from the mother, several mechanisms seem to have evolved in oocytes to prevent them from accumulating mtDNA damage (Fan *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2008; Sharpley *et al.*, 2012; Floros *et al.*, 2018). Herein, we discuss the role of mitochondria on oocyte developmental potential and recent evidence supporting a purifying filter against deleterious mtDNA mutations in oocytes.

#### Oocyte development

Mammalian females harbor at birth millions of primordial follicles containing oocytes at prophase I of meiosis, which constitutes the follicular reserve. Awakening of dormant oocytes in primordial follicles relies on the PI3K-AKT signaling pathway (Liu *et al.*, 2014; Saatcioglu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018). In turn, activation of this pathway leads to several alterations in the oocyte, including enhanced protein translation, cell growth and secretion of members of the Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  superfamily such as GDF9 and BMP15 (Knight and Glistler, 2006). As a consequence, the pre-granulosa cells differentiate into granulosa cells and proliferate rapidly (Fig. 1). Later on, with the antrum formation, the various layers of granulosa cells are subdivided into mural granulosa cells (outer layers) and cumulus cells (inner layers). While mural granulosa cells play a central role in hormone and ligand synthesis (i.e., activins and follistatin), cumulus cells interact with the oocyte to support its development. With the antrum formation, mural granulosa cells express high levels of

<sup>6</sup>Corresponding author: chiarattimr@gmail.com

Received: May 7, 2018

Accepted: July 4, 2018



FSH receptors, leading the follicular development to be strongly dependent on FSH concentration in the antrum.

The pre-ovulatory phase in its turn is characterized by a remodeling in morphology and biochemistry of mural granulosa cells, which produce increasing levels of estradiol and inhibin, besides initial expression of LH receptor. Estradiol and inhibin act on the pituitary, inhibiting FSH secretion. Simultaneously, the increasing levels of estradiol induce GnRH secretion and the consequent release of LH. Consequently, the progression to the peri-ovulatory follicle is characterized by cumulus cells expansion and blockage of mural granulosa cells proliferation. Ultimately, this leads to ovulation of an oocyte that should be competent for fertilization and capable of supporting the development of a viable offspring (Binelli and Murphy, 2010).

During follicular development, granulosa cells intimately interact with the oocyte through transzonal projections (TZPs). Hence, the metabolism of granulosa cells is modulated in favor of the gamete's needs

through oocyte-derived factors (i.e., GDF9, BMP15 and FGF8B). In addition, the oocyte is devoid of various enzymes of glycolysis and cholesterol biosynthesis and does not have receptors for the uptake of some amino acids. Consequently, adenosine triphosphate (ATP), pyruvate, amino acids and cholesterol must be captured or produced by granulosa cells and supplied to the oocyte (Su *et al.*, 2007; Sugiura *et al.*, 2007). Nonetheless, near ovulation the oocyte loses contact with cumulus cells, having to support its own needs (Fig. 1). This represents a huge challenge for the gamete as maturation requires great energy input. Oocyte maturation involves nuclear and cytoplasmic maturation: nuclear maturation is characterized by germinal vesicle (GV) breakdown (GVBD), meiotic progression to metaphase-II (MII) stage and extrusion of the first polar body (PB1); cytoplasmic maturation includes redistribution of organelles such as mitochondria, the endoplasmic reticulum and cortical granules (Collado-Fernandez *et al.*, 2012).

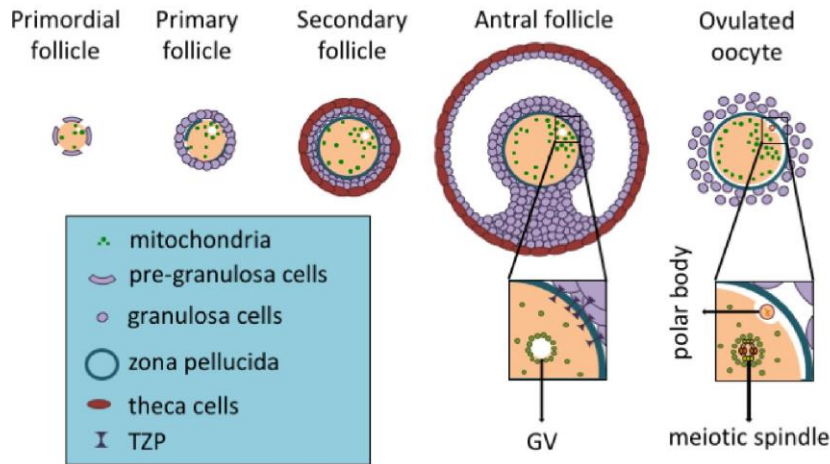


Figure 1. Mitochondrial cycle during folliculogenesis. Throughout folliculogenesis both mitochondria and mitochondrial DNA (mtDNA) amount increase, reaching their highest numbers in ovulated oocytes (on the very right). It is also noted the mitochondrial displacement, being close to the germinal vesicle (GV) and later moving around the meiotic spindle (on the ovulated oocyte), provides energy at specific sites with higher demand. Also, transzonal projections (TZPs) are present up to the antral follicle, being absent in the ovulated oocyte. Granulosa cells use TZPs to closely interact with the oocyte and supply it with several molecules, including ATP, pyruvate, cholesterol and amino acids. Once TZPs are broken up, the oocyte has to rely on its own stores.

**Oocyte mitochondria**

Mitochondria play a central role in cellular energy metabolism, besides being involved in calcium (Ca<sup>2+</sup>) handling, biogenesis of iron-sulfur clusters, apoptosis, etc. ATP is produced inside mitochondria through the transport of electrons, which are derived from reducing equivalents (i.e., NADH and FADH<sub>2</sub>). These electrons are carried along complexes I, II, III and IV of the electron transport chain, which are located in the inner mitochondrial membrane. Hence, there is the pumping of protons (H<sup>+</sup>) from the matrix to the inter-membrane space, generating a mitochondrial

membrane potential (ΔΨ<sub>m</sub>) that is further used by complex V as the driving force for ATP synthesis. Compared to glycolysis, oxidative phosphorylation makes it possible to produce 18 times more ATP from the same amount of glucose. On the other hand, energy generation in mitochondria may result in production of ROS, which are potentially harmful to protein folding and structure, besides leading to mtDNA mutations.

The number of mitochondria increases during the oocyte development and it can reach up to approximately one hundred thousand in mature oocytes (Jansen and De Boer, 1998). During the same period, mtDNA copy number increases a thousand-fold,



reaching ~200,000 molecules in fully-grown oocytes (Cao *et al.*, 2007; Cree *et al.*, 2008; Wai *et al.*, 2008; Fig. 1). Thus, among all cell types in mammals, the oocyte owns the largest content of mitochondria and mtDNA. Considering that for most somatic tissues there is a strong link between mitochondrial content and oxidative capacity, these findings suggest the gamete requires a great energy input for its development. However, two other characteristics of oocytes contrast with this belief: i) the existence of a decreased number of mtDNA molecules (i.e., one or two molecules) per organelle; and, ii) the immature architecture of mitochondria in oocytes (i.e., fragmented, rounder and smaller), in comparison with the elongated mitochondrial morphology in most somatic cells (Wassarman and Josefowicz, 1978; Jansen and De Boer, 1998; Motta *et al.*, 2000; Chiaratti *et al.*, 2018; Fig. 2). Together, these characteristics support a state of low oxidative activity, possibly minimizing the negative effects of ROS generation on the gamete (Chen and Chan, 2017).

In fact, oocytes with impaired mitochondrial function can grow, be ovulated and even fertilized (Johnson *et al.*, 2007). In keeping with this, granulosa cells closely interact with the oocyte through TZPs to supply it with energetic molecules such as ATP and pyruvate. Actually, this role of granulosa cells is modulated by factors secreted by the gamete, which stimulate glycolytic activity, TZP formation, and other functions (Su *et al.*, 2007; Sugiura *et al.*, 2007; El-Hayek *et al.*, 2018). Thus, in a mitochondrial dysfunction condition, the oocyte likely takes advantage of granulosa cells to modulate their metabolism in favor of its own needs.

In light of the above information, why do oocytes store so many mitochondria if they are not required for oogenesis? This can be answered, at least partially, by the role these organelles play during the maturation period and early embryogenesis. With the LH surge and consequent cumulus cells expansion, TZP are lost and can no longer support the gamete (Fig. 1). As a consequence, the oocyte must rely on its own energetic sources, including ATP, pyruvate and mitochondria stored early during oogenesis (Kruip *et al.*, 1983; Fair *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2007). Mitochondrial dysfunctions that do not affect early oogenesis can indeed impair oocyte maturation, leading to infertility (Thouas *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Ben-Meir *et al.*, 2015; Boucret *et al.*, 2015; May-Panloup *et al.*, 2016). During oocyte maturation, mitochondria are highly mobile, clustering at specific sites (i.e., around GV and spindles) to assure the energy requirement to be met (Kruip *et al.*, 1983; Yu *et al.*, 2010; Udagawa *et al.*, 2014; Wakai *et al.*, 2014). Thus, the large number of mitochondria possibly counterbalance their decreased activity, assuring energy demand to be supplied locally, without excessive ROS generation (Fig. 1).

### Ruminant mitochondria

Mitochondrial architecture in ruminant oocytes

grossly resembles that of rodents, with exception of some peculiarities. During early development, mitochondria in oocytes from primordial to secondary follicles are predominantly round, with only a few assuming an elongated shape. However, the elongated form become more often with follicle development, representing approximately half of the mitochondrial population in oocytes from early antral follicles. Further on development, elongated mitochondria are replaced by hooded mitochondria, which are unique to ruminants. The role of hooded mitochondria is unclear, but they are the most abundant shape in fully-grown oocytes (Fair *et al.*, 1997). During early oocyte maturation, these mitochondria become markedly aggregated and move to a more peripheral position. In addition, mitochondrial clusters associate with lipid droplets and elements of smooth endoplasmic reticulum, which together are termed metabolic units. It is assumed that the uncoupling of cumulus cells from the oocyte requires gamete mitochondria to provide the necessary energy for protein synthesis and the continuation of meiosis and cytoplasmic maturation. In light of this, formation of metabolic units should facilitate conversion of lipids and carbohydrates in ATP. In agreement with this, near ovulation, when the oocyte completes its maturation, the metabolic units migrate to the center of the gamete and the cluster of organelles disaggregates (Kruip *et al.*, 1983).

### Mitochondrial dynamics

Mitochondrial dynamics is regulated by the counteracting forces of fusion and fission, which determine mitochondrial morphology, localization and activity (Twig and Shirihai, 2011; Mishra and Chan, 2014). Mitochondrial fusion is orchestrated by three dynamin-related GTPases – Mitofusin 1 (MFN1) and Mitofusin 2 (MFN2) on the outer mitochondrial membrane and Optic Atrophy 1 (OPA1), on the inner mitochondrial membrane; whereas a larger GTPase, Dynamin 1-like (DNM1L or DRP1) and accessory factors present on the outer mitochondrial membrane mediate organelle constriction and fission. MFN1 promotes mitochondrial docking leading to initiation of fusion while functionally interacting with OPA1, enabling the occurrence of basal levels of fusion in the absence of MFN2 (Mishra and Chan, 2014; Schrepfer and Scorrano, 2016). On the other hand, MFN2 acts in subsequent steps of mitochondrial fusion and plays alternative roles in the cell such as regulation of energetic metabolism. MFN2 is also present on endoplasmic reticulum membrane where it controls morphology and tethering with mitochondria (Schrepfer and Scorrano, 2016). As a result, MFN1 deficiency has a larger impact on mitochondrial fusion compared to the lack of MFN2. Yet, complete absence of either MFN1 or MFN2 is embryonic lethal in mice and mutations in MFN2 are associated with metabolic and neurodegenerative diseases in humans (Mishra and Chan, 2014; Schrepfer and Scorrano, 2016).

With respect to oocytes, the unique characteristics of their mitochondria likely rely on



increased rate of fission in relation to fusion (Wassarman and Josefowicz, 1978; Fair *et al.*, 1997; Motta *et al.*, 2000; Mishra and Chan, 2014; Fig. 2). This assumption is supported by the finding that ablation of fission leads to mitochondrial elongation in mouse oocytes (Udagawa *et al.*, 2014). Yet, overexpression of MFN1 or MFN2 does not cause mitochondrial elongation in oocytes (Wakai *et al.*, 2014), suggesting that keeping mitochondria fragmented is critical for the gamete. In fact, mice with oocytes deficient for mitochondrial fission are infertile (Udagawa *et al.*, 2014), whereas overexpression of fusion genes impairs oocyte viability (Wakai *et al.*, 2014). This effect was explained by accentuated interaction between organelles (i.e., mitochondrion-mitochondrion and mitochondrion-endoplasmic reticulum), possibly mediated by the increased levels of either MFN1 or MFN2. Moreover, overexpression of MFN2 markedly disintegrated the endoplasmic reticulum network as this organelle was heavily tethered to mitochondria, thus preventing their proper migration through the cytoplasm. As a result,  $Ca^{2+}$  stores in the endoplasmic reticulum were severely depleted (Wakai *et al.*, 2014).

Since oocyte mitochondria compensate their decreased metabolic state being highly dynamic (Kruip *et al.*, 1983; Fair *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2010), increased mitochondrial fragmentation, without excessive tethering, might be required to meet the oocyte's needs. However, this does not imply that fusion is absent in oocytes, as mitochondrial mobility is dependent on fusion (Chen *et al.*, 2003, 2005; Tang, 2015). In addition, fusion is essential for the function of the organelle as cells lacking mitochondrial fusion have a severe defect in respiratory capacity and mtDNA instability (Chen *et al.*, 2003, 2005, 2010; Papanicolaou *et al.*, 2012; Mishra and Chan, 2014; Schrepfer and Scorrano, 2016). Repeated cycles of fission and fusion are needed for homogenization of the mitochondrial content (including proteins, RNAs and mtDNA) among organelles within the cytoplasm (Kowald and Kirkwood, 2011; Mishra and Chan, 2014), which should be critical in oocytes considering their large size. Finally, the mitochondrial quality control is intrinsically involved with mitochondrial dynamics (Twig and Shirihai, 2011; Aanen *et al.*, 2014), suggesting that increased fission enhances clearing of damaged organelle in oocytes.

#### Mitochondrial inheritance

In mammals, mtDNA has ~16.5 kb and encodes 37 genes, 13 messenger RNAs (mRNAs), 2 ribosomal RNAs (rRNAs) and 22 transporter RNAs (tRNAs). All 13 polypeptides encoded by mtDNA, together with polypeptides encoded by nuclear DNA, make up complexes I, III, IV and V of the electron transport chain (Wallace and Chalkia, 2013). Since mtDNA contains almost no intergenic regions and is devoid of introns, mutations are more likely to affect its protein coding than what is expected for nuclear DNA. In addition, mitochondria are a major site of ROS generation in cells, which makes mtDNA prone to

mutation onset (Wallace and Chalkia, 2013; Stewart and Chinnery, 2015). Mutations in mtDNA can encompass the entire pool of mtDNA in the cell (which is defined as homoplasmy) or only a fraction (heteroplasmy). Since most mtDNA mutations are recessive, in case of heteroplasmy, the mutation effect will depend on the mutation load (Schon *et al.*, 2012). Also, constant events of mitochondrial fusion and fission enable mitochondria to complement each other, minimizing mutation consequences on the cell (Wallace and Chalkia, 2013; Mishra and Chan, 2014).

In mammals, the frequency of a mtDNA haplotype present in heteroplasmy varies in offspring around the frequency in the progenitor, and homoplasmy tends to be reestablished within few generations (Jenuth *et al.*, 1996). This rapid segregation pattern is proposed to result from the mitochondrial genetic bottleneck. Accordingly, mtDNA is not replicated in the female germline during early development, resulting in a few dozens of copies in primordial germ cells (PGCs). Therefore, the reduction of mtDNA copy number by a thousand fold between fertilization and formation of PGCs is pointed out to force segregation of mtDNA variants (Cao *et al.*, 2007; Cree *et al.*, 2008; Wai *et al.*, 2008). Moreover, only a small number of the cells among thousands present in the embryo give rise to PGCs, and not the entire pool of mtDNA in oogonia seems to be used as template for replication of mtDNA during oocyte development (Wallace and Chalkia, 2013; Chiaratti *et al.*, 2018).

Even though the bottleneck theory is widely accepted, some of its molecular aspects are poorly understood, as well as it does not account for a purifying filter in the germline against mtDNA mutations (Sato *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2008; Freyer *et al.*, 2012; Sharpley *et al.*, 2012). This filter suggests that the oocyte actively eliminates deleterious mtDNA mutations based on their effect on mitochondrial function. The unique characteristics of mitochondria in the germline have been proposed to enhance selection against organelles with deleterious mutations (Floros *et al.*, 2018). More specifically, the lower mtDNA content and the fragmented network of oocyte mitochondria (Fig. 2) might minimize organelle complementation, further facilitating destruction by selective autophagy.

Mitochondria are constantly eliminated and renewed in the cell based on a mechanism of quality control that ensures their functionality. Mitochondrial elimination involves a selective form of autophagy (i.e., hereafter called mitophagy) through which the whole organelle, including its mtDNA molecules, is destroyed. This is underpinned by selective accumulation of PINK1 in the outer membrane of dysfunctional mitochondria, which results in the phosphorylation of proteins attached to this membrane, including PARKIN that is recruited from the cytosol (Narendra *et al.*, 2008; Chen and Dorn, 2013; Lazarou *et al.*, 2015; Swatek and Komander, 2016). Next, mitophagy receptors such as NDP52 and OPTN bind to ubiquitinated mitochondrial proteins and recruit the autophagic machinery (Lazarou *et al.*, 2015). Eventually, autophagosomes are



responsible for engulfing the organelle, leading to its destruction in lysosomes (Swatek and Komander, 2016). Importantly, this pathway is intrinsically associated with mitochondrial dynamics. In one hand, fusion enables mitochondrial complementation through mixing the content of impaired mitochondria with that of functional ones. On the other hand, fission removes dysfunctional organelles from their network, further preventing their fusion and complementation, then leading to their destruction by mitophagy.

In somatic tissues, mitophagy is part of the turnover mechanism responsible for eliminating damaged organelles. Deficiency in this mechanism results in mitochondrial dysfunction and accumulation of defective organelles, which seem to be a key factor during aging (Sebastián and Zorzano, 2016). However, as mentioned above, some unique characteristics of oocytes make them more prone for mitophagy than

somatic cells. Fragmentation of the mitochondrial network suggests fission is increased in oocytes in relation to fusion (Fig. 2), which might facilitate elimination of dysfunctional organelles. In addition, the lower content of mtDNA per mitochondrion together with decreased fusion likely prevent organelle complementation and enhance detection and elimination of dysfunctional mitochondria with mutant molecules. In support of this, mitophagy underpins elimination of all paternal mitochondria shortly after fertilization (Rojansky *et al.*, 2016). Paternal mitochondria lose  $\Delta\Psi_m$  after entering the oocyte, which seems to be the trigger for mitochondrial degradation. As a consequence, this recruits PARKIN and MUL1 to paternal mitochondria, which are tagged for degradation in lysosomes by ubiquitination (Sutovsky *et al.*, 1999; Al Rawi *et al.*, 2011; Boucrot *et al.*, 2015; Rojansky *et al.*, 2016).

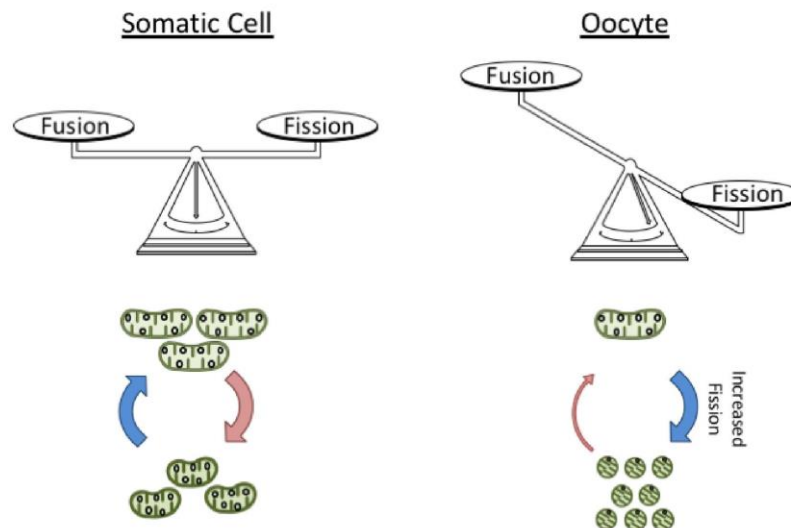


Figure 2. Mitochondrial architecture in germ and somatic cells. For most somatic cells the mitochondrial architecture seems to be kept by a balance between the rates of organelle fusion and fission. In comparison, oocyte mitochondria display a rounder appearance and fragmented network, suggesting there is an imbalance in the organelle dynamics. More specifically, oocyte mitochondria seem to be more prone to fission than fusion.

### Conclusion

Oocyte mitochondria display unique characteristics in terms of morphology, numbers and content of mtDNA, which underpin the key role of mitochondria to oocyte competence. In addition, these characteristics are important to prevent the gamete from oxidative damage, besides contributing with mitochondrial homoplasmy and elimination of deleterious mtDNA mutations.

### Acknowledgments

The authors acknowledge funding from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – grant # 2012/50231-6 and 2017/05899-2 to M.R.C.; 2016/11935-9 to B.M.G.; 2016/11942-5 to K.F.C.; 2016/07868-4 to C.H.M.), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – fellowship to T.S.M.) and the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – UFSCar (PIBIC/UFSCar – fellowship to F.K.S.R.).



## References

- Aanen DK, Spelbrink JN, Beekman M. 2014. What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369:20130438.
- Al Rawi S, Louvet-Vallée S, Djeddi A, Sachse M, Culetto E, Hajjar C, Boyd L, Legouis R, Galy V. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334:1144-1147.
- Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, Chong J, Wong E, Yavorska T, Naranian T, Chi M, Wang Y, Bentov Y, Alexis J, Meriano J, Sung HK, Gasser DL, Moley KH, Hekimi S, Casper RF, Jurisicova A. 2015. Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. *Aging Cell*, 14:887-895.
- Binelli M, Murphy BD. 2010. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fertil Dev*, 22:1-12. doi: 10.1071/RD09218.
- Boucret L, Chao De La Barca JM, Morinière C, Desquiere V, Ferré-L'Hôtelier V, Descamps P, Marcaillou C, Reynier P, Procaccio V, May-Panloup P. 2015. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Hum Reprod*, 30:1653-1664.
- Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J-I, Yonekawa H. 2007. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet*, 39:386-390.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160:189-200.
- Chen H, Chomyn A, Chan DC. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280:26185-2692.
- Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. 2010. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, 141:280-289.
- Chen H, Chan DC. 2017. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells. *Cell Metab*, 26:39-48.
- Chen Y, Dorn G. 2013. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340:471-476.
- Chiaratti MR, Ferreira CR, Perecin F, Méo SC, Sangalli JR, Mesquita LG, de Carvalho Balieiro JC, Smith LC, Garcia JM, Meirelles FV. 2011. Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. *Reprod Biomed Online*, 22:172-183.
- Chiaratti MR, Garcia BM, Carvalho KF, Machado TS, Ribeiro FK da S, Macabelli CH. 2018. The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. *Cell Biol Int*, 42:711-724.
- Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. 1997. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*, 350:186-187.
- Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. 2012. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*, 56:799-808.
- Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl H-HM, Chinnery PF. 2008. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet*, 40:49-54.
- Dale B, Wilding M, Botta G, Rasile M, Marino M, Di Matteo L, De Placido G, Izzo A. 2001. Pregnancy after cytoplasmic transfer in a couple suffering from idiopathic infertility: case report. *Hum Reprod*, 16:1469-1472.
- de Paz P, Sánchez AJ, De la Fuente J, Chamorro CA, Alvarez M, Anel E, Anel L. 2001. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology*, 55:1107-1116.
- Duran HE, Simsek-Duran F, Oehninger SC, Jones HW, Castora FJ. 2011. The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. *Fertil Steril*, 96:384-388.
- El-Hayek S, Yang Q, Abbasi L, FitzHarris G, Clarke HJ. 2018. Mammalian oocytes locally remodel follicular architecture to provide the foundation for germline-soma communication. *Curr Biol*, 28:1124-1131.e3.
- El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC. 2006. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, 131:233-245.
- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol*, 195:327-336.
- Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC. 2008. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*, 319:958-962.
- Floros VI, Pyle A, Dietmann S, Wei W, Tang WCW, Irie N, Payne B, Capalbo A, Noli L, Coxhead J, Hudson G, Crosier M, Strahl H, Khalaf Y, Saitou M, Ilic D, Surani MA, Chinnery PF. 2018. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nat Cell Biol*, 20:144-151.
- Freyer C, Cree LM, Mourier A, Stewart JB, Koolmeister C, Milenkovic D, Wai T, Floros VI, Hagström E, Chatzidaki EE, Wiesner RJ, Samuels DC, Larsson N-G, Chinnery PF. 2012. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nat Genet*, 44:1282-1285.
- Guo J, Zhang T, Guo Y, Sun T, Li H, Zhang X, Yin H, Cao G, Yin Y, Wang H, Shi L, Guo X, Sha J, Eppig JJ, Su Y-Q. 2018. Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115:E5326-E5333.
- Hua S, Zhang Y, Li X-C, Ma L-B, Cao J-W, Dai J-P,



- Li R. 2007. Effects of granulosa cell mitochondria transfer on the early development of bovine embryos in vitro. *Cloning Stem Cells*, 9:237-246.
- Huang CC, Cheng TC, Chang HH, Chang CC, Chen CI, Liu J, Lee MS. 1999. Birth after the injection of sperm and the cytoplasm of tripronucleate zygotes into metaphase II oocytes in patients with repeated implantation failure after assisted fertilization procedures. *Fertil Steril*, 72:702-706.
- Jansen RPS, De Boer K. 1998. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol*, 145:81-88.
- Jenuth J, Peterson A, Fu K, Shoubridge E. 1996. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 14:146-151.
- Johnson MT, Freeman EA, Gardner DK, Hunt PA. 2007. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. *Biol Reprod*, 77:2-8. doi: 10.1095/biolreprod.106.059899.
- Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132:191-206.
- Kowald A, Kirkwood TBL. 2011. Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:10237-10242.
- Kruip TAM, Cran DG, van Beneden TH, Dieleman SJ. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res*, 8:29-47.
- Lanzendorf SE, Mayer JF, Toner J, Oehninger S, Saffan DS, Muasher S. 1999. Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes. *Fertil Steril*, 71:575-577.
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ. 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524:309-314.
- Lee S, Zhao M, Kwon J, Li Y, Lin Z, Jin Y, Kim N, Cui X. 2014. The association of mitochondrial potential and copy number with pig oocyte maturation and developmental potential. *J Reprod Dev*, 60:128-135.
- Liu K, Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, Boshach B, Brännström M. 2014. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol*, 24:2501-2508.
- May-Panloup P, Chrétien MF, Jacques C, Vasseur C, Malthiery Y, Reynier P. 2005. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, 20:593-597.
- May-Panloup P, Boucret L, Chao de la Barca J-M, Desquiret-Dumas V, Ferré-L'Hotellier V, Morinière C, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. 2016. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Hum Reprod Update*, 22:725-743.
- Mishra P, Chan DC. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15:634-646.
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. 2000. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod*, 15(suppl. 2):129-147.
- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183:795-803.
- O'Brien J, Dwarte D, Ryan J, Maxwell W, Evans G. 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev*, 8:1029-1037.
- Oktay K, Baltaci V, Sonmezer M, Turan V, Unsal E, Baltaci A, Aktuna S, Moy F. 2015. Oogonial precursor cell-derived autologous mitochondria injection to improve outcomes in women with multiple IVF failures due to low oocyte quality: a clinical translation. *Reprod Sci*, 22:1612-1617.
- Papanicolaou KN, Kikuchi R, Ngho GA, Coughlan KA, Dominguez I, Stanley WC, Walsh K. 2012. Mitofusins 1 and 2 are essential for postnatal metabolic remodeling in heart. *Circ Res*, 111:1012-1026.
- Reader KL, Cox NR, Stanton JAL, Juengel JL. 2015a. Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology*, 83:1484-1492.
- Reader KL, Cox NR, Stanton JAL, Juengel JL. 2015b. Mitochondria and vesicles differ between adult and prepubertal sheep oocytes during IVM. *Reprod Fertil Dev*, 27:513-522.
- Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiery Y. 2001. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 7:425-429.
- Rojansky R, Cha M-Y, Chan DC. 2016. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife*, 5:pil17896. doi: 10.7554/eLife.17896.
- Saatcioglu HD, Cuevas I, Castrillon DH. 2016. Control of oocyte reawakening by kit. *PLoS Genet*, 12:e1006215. doi: 10.1371/journal.pgen.1006215.
- Sato A, Nakada K, Shitara H, Kasahara A, Yonekawa H, Hayashi J-I. 2007. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Genetics*, 177:2031-2037.
- Schon E a DiMauro S, Hirano M. 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*, 13:878-890.
- Schrepfer E, Scorrano L. 2016. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol Cell*, 61:683-694.
- Sebastián D, Zorzano A. 2016. When MFN2 (mitofusin 2) met autophagy: a new age for old muscles. *Autophagy*, 12:2250-2251.
- Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, Lin CS, Masubuchi S, Friend N, Koike M, Chalkia D, MacGregor G, Sassone-Corsi P, Wallace DC. 2012. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell*, 151:333-343.
- Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Wredenberg A, Cansu Z, Trifunovic A, Larsson N-G. 2008. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol*, 6:e10. doi: 10.1371/journal.pbio.0060010.
- Stewart JB, Chinnery PF. 2015. The dynamics of



- mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, 16:530-542.
- Su Y-Q, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ.** 2007. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135:111-121.
- Sugiura K, Su Y-Q, Diaz FJ, Pangas S a Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ.** 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134:2593-2603.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G.** 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402:371-372.
- Swatek KN, Komander D.** 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 26:399-422.
- Tang BL.** 2015. MIRO GTPases in mitochondrial transport, homeostasis and pathology. *Cells*, 5(1):pii:E1. doi: 10.3390/cells5010001.
- Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A.** 2001. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod*, 65:141-150.
- Thouas GA, Trounson AO, Wolvetang EJ, Jones GM.** 2004. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol Reprod*, 71:1936-1942.
- Twig G, Shirihai OS.** 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*, 14:1939-1951.
- Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N.** 2014. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol*, 24:2451-2458.
- Wai T, Teoli D, Shoubridge EA.** 2008. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet*, 40:1484-1488.
- Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA.** 2010. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod*, 83:52-62.
- Wakai T, Harada Y, Miyado K, Kono T.** 2014. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*, 20:1090-1100.
- Wallace DC, Chalkia D.** 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5:a021220. doi: 10.1101/cshperspect.a021220.
- Wassarman PM, Josefowicz WJ.** 1978. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J Morphol*, 156:209-235.
- Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K.** 2010. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*, 224:672-680.
- Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X.** 2006. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res*, 16:841-850.



ANEXO 3. Submissão de manuscrito para Plos Biology, sendo intitulado “Mitofusin 1 is required for the oocyte-granulosa cell communication that regulates oogenesis”.

## PLOS Biology

### Mitofusin 1 is required for the oocyte-granulosa cell communication that regulates oogenesis --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PBIOLOGY-D-18-01467
<b>Full Title:</b>	Mitofusin 1 is required for the oocyte-granulosa cell communication that regulates oogenesis
<b>Article Type:</b>	Initial Research Submission
<b>Corresponding Author:</b>	Marcos Chiaratti Universidade Federal de São Carlos São Carlos, BRAZIL
<b>First Author:</b>	Marcos Chiaratti
<b>Order of Authors:</b>	Marcos Chiaratti
<b>Abstract:</b>	Mitochondrial function, largely regulated by the dynamics of this organelle, is inextricably linked to oocyte health. While the proteins that modulate mitochondrial fusion, Mitofusin 1 (MFN1) and 2 (MFN2), are required for embryogenesis, their role in oocyte development remains unclear. Here we show that the oocyte-specific deletion of Mfn1, but not Mfn2, results in a complete loss of oocyte growth and ovulation due to a block in folliculogenesis at the preantral-to-antral follicle transition. We pinpoint the loss of oocyte ovulation to disrupted oocyte-somatic cell communication – Mfn1-null oocytes are deficient for the production of the important somatic cell signaling factor GDF9. Unexpectedly, the double loss of Mfn1 and Mfn2 mitigates the effects on oocyte growth and ovulation, which is explained by a partial rescue of oocyte-somatic cell communication and folliculogenesis. Together, this work demonstrates that mitochondrial function influences communication of oocyte with follicular somatic cells and suggests that the balanced expression of modulators of mitochondrial dynamics is critical for proper oocyte development.
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>

1 **Mitofusin 1 is required for the oocyte-granulosa cell communication that**  
2 **regulates oogenesis**

3

4 Thiago S. Machado<sup>1,2,8</sup>, Karen F. Carvalho<sup>1,8</sup>, Bruna M. Garcia<sup>1,8</sup>, Amanda F.  
5 Zangirolamo<sup>3</sup>, Carolina H. Macabelli<sup>1</sup>, Fabrícia H. C. Sugiyama<sup>1</sup>, Mateus P.  
6 Grejo<sup>1</sup>, J. Djaci Augusto Neto<sup>1</sup>, Fernanda K. S. Ribeiro<sup>1</sup>, Fabiana D. Sarapião<sup>3</sup>,  
7 Flávio V. Meirelles<sup>2,4</sup>, Francisco E. G. Guimarães<sup>5</sup>, Lena Pernas<sup>6</sup>, Marcelo M.  
8 Seneda<sup>3</sup>, Marcos R. Chiaratti<sup>1,2,7</sup>

9 <sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos,  
10 São Carlos, 13565-905, Brazil

11 <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,  
12 São Paulo, 05508-270, Brazil

13 <sup>3</sup>Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina,  
14 Londrina, 85057-970, Brazil

15 <sup>4</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São  
16 Paulo, Pirassununga, 13635-900, Brazil

17 <sup>5</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,  
18 13563-120, Brazil

19 <sup>6</sup>Max Planck Institute for Biology of Ageing, Cologne, 50931, Germany

20 <sup>7</sup>Lead Contact