

BRUNA MARTINS GARCIA

Efeito do nocaute da mitofusina 2 sobre a mitocôndria, o retículo endoplasmático e a mitofagia em oócitos murinos

São Carlos – SP

2018

BRUNA MARTINS GARCIA

Efeito do nocaute da mitofusina 2 sobre a mitocôndria, o retículo endoplasmático e a mitofagia em oócitos murinos

Versão revisada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Departamento:

Genética e Evolução

Área de concentração:

Biologia molecular

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos – SP

2018

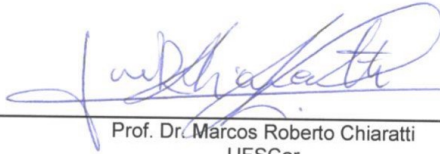


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Martins Garcia, realizada em 24/08/2018:



Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
UFSCar



Prof. Dr. Felipe Percin
USP



Profa. Dra. Maite Del Collado Barrondo
USP

DEDICATÓRIA

A Deus, que me concedeu a força, saúde e determinação necessária.

Aos meus pais e irmã pelo apoio e amor incondicional em cada fase dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que me sustentou nos momentos mais difíceis dessa jornada, sendo meu amparo e consolo. Por ter me dado toda a força e determinação necessária para concluir essa etapa. Pelas oportunidades que surgiram e pela sabedoria para saber reconhecê-las e aproveitá-las ao máximo. A Ti toda honra e toda glória.

À minha família, pelo amor incondicional. Essa conquista não teria sido possível sem o apoio, carinho e sacrifícios feitos desde o meu nascimento. Aos meus pais e irmã por terem não só compreendido, mas também por terem pego parte da dor para si a fim de aliviar o peso em meus ombros. Ao meu querido noivo, Alvaro Ricardo Guiato Catellan, por ter me apresentado o amor mais puro e verdadeiro. Obrigada pelos sacrifícios diários e, por em muitas partes desse trajeto, ter me carregado no colo quando eu não conseguia mais caminhar.

Aos meus companheiros de laboratório, alunos, estagiários, técnicos, seguranças e equipe da limpeza. Em especial aos meus companheiros Thiago Simões Machado, Karen Freire Carvalho e Fernanda Karina Ribeiro da Silva por terem não só me auxiliado em meus experimentos incondicionalmente, mas mais importante ainda, por terem sido meu refúgio, ombro para minhas lágrimas e apoio em todos os momentos de dificuldade que passamos juntos. Nossa amizade e momentos estarão para sempre em meu coração. Muito obrigada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti que me auxiliou não apenas no desenvolvimento dessa dissertação, mas que também me orientou e me aconselhou em diversos aspectos da minha vida profissional. Ao Prof. Dr. Luca Scorrano e à Dra. Marta Giacomello da Universidade de Padova, por terem me acolhido e me orientado durante minha estadia em seu laboratório. Aos doutores Maite del Collado e Juliano Rodrigues Sangalli pela eterna disposição e paciência para o ensino e compartilhamento do conhecimento.

À Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos que proporcionou os recursos e infraestrutura necessários para a realização desta pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2016/11935-9, 2012/50231-6 e 2017/05899-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo financiamento desse projeto.

“Não me preocupo com o que pode acontecer daqui a cem anos. Aquele que governava o mundo antes de eu nascer cuidará disso igualmente, quando eu estiver morto. À minha parte é melhorar o momento presente”

John Wesley

BRUNA, M. G. Effect of mitofusin 2 knockout on mitochondria, endoplasmic reticulum and mitofagia in murine oocytes. [Efeito do nocaute da mitofusina 2 sobre a mitocôndria, o retículo endoplasmático e a mitofagia em oócitos murinos] 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

RESUMO

As mitofusinas 1 (MFN1) e 2 (MFN2) são GTPases transmembranares presentes na membrana mitocondrial externa e envolvidas na regulação da fusão mitocondrial. Uma vez que o MFN2 também está presente na membrana do retículo endoplasmático (RE), ele também é responsável por regular a morfologia e a interação deste com a mitocôndria. Assim, são crescentes as evidências de que o MFN2 desempenha um papel chave na regulação da função mitocondrial e do RE, assim como, da via autofágica. Todavia, pouco se sabe sobre a sua função no oócito. Recentemente, observamos que o *knockout* condicional do *Mfn2* em oócitos murinos (*Mfn2*-null) não altera significativamente a fertilidade, mas resulta em hiperglicemia na prole. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos moleculares que resultam nesses fenótipos. Os efeitos do *knockout* condicional do *Mfn2* no oócito foram avaliados considerando a função da mitocôndria, do RE e a ocorrência de mitofagia. Para isso, primeiramente confirmamos os efeitos do *knockout* condicional do *Mfn2*. Oócitos *knockout* para *Mfn2* foram capazes de se desenvolver normalmente quando maturados *in vitro*. Já os filhotes oriundos de oócitos *knockout* demonstraram alterações nos níveis de glicose sanguínea nos testes de intolerância a glicose e resistência a insulina quando comparados com os filhotes oriundos de oócitos selvagens (WT). Além disso, encontramos nas mitocôndrias de oócitos *knockout* alterações de número (WT = $0,061 \pm 0,004$ e *Mfn2*-null = $0,037 \pm 0,003$ organela/ μm^2), morfologia das cristas, área (WT = $0,589 \pm 0,015$ e *Mfn2*-null = $1,673 \pm 0,101 \mu\text{m}^2$) e contato com o RE. Todavia, o *knockout* do *Mfn2* resultou em diminuição do conteúdo lipídico em oócitos ovulados (WT = $13,07 \pm 0,96$ e *Mfn2*-null = $9,65 \pm 0,64\%$ de área de ooplasma ocupada por lipídeos). Ademais, não foi encontrado indícios a nível transcricional de estresse do RE. No que diz respeito a mitofagia, não foi encontrado efeito do *knockout* do *Mfn2* sobre a expressão de genes participantes dessa via, assim como sobre a co-localização entre mitocôndrias e autofagossomos (WT = $0,65 \pm 0,05$ e *Mfn2*-null = $0,53 \pm 0,04$ U.A). Sendo assim, esses achados demonstram que o *knockout* condicional do *Mfn2* no oócito resulta em alterações metabólicas na prole devido, muito provavelmente, as alterações na morfologia, função e contato entre mitocôndria e RE. Todavia, o mecanismo molecular pelo qual isso ocorre ainda carece de elucidação. Ainda, demonstramos que o *knockout* condicional do *Mfn2* pode vir a ser um bom modelo para o estudo da herança de síndromes metabólicas.

Palavras-chave: oócito, mitofusina 2, mitocôndria, retículo endoplasmático e síndrome metabólica.

BRUNA, M. G. Effect of mitofusin 2 knockout on mitochondria, endoplasmic reticulum and mitofagia in murine oocytes. 2018. 81 p. Master thesis (Master in Evolutionary Genetics and Molecular Biology) – Federal University of São Carlos, São Carlos, 2018.

ABSTRACT

Mitofusins 1 (MFN1) and 2 (MFN2) are transmembrane GTPases present in the outer mitochondrial membrane and involved in the regulation of mitochondrial fusion. Since MFN2 is also present in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), it is also responsible for regulating the morphology and its interaction with the mitochondria. Thus, there is increasing evidence that MFN2 plays a key role in the regulation of mitochondrial function and ER, as well as the autophagic pathway. However, little is known about its role in the oocyte. Recently, we have observed that the conditional knockout of Mfn2 in murine oocytes (Mfn2-null) does not significantly alter fertility, but results in hyperglycemia in the offspring. Therefore, the objective of this work was to investigate the molecular mechanisms that result in these phenotypes. The effects of the conditional knockout of Mfn2 on the oocyte were evaluated considering the function of mitochondria, RE and the occurrence of mitofagia. For this, we first confirmed the effects of the conditional knockout of Mfn2. Knockout oocytes for Mfn2 were able to develop normally when matured in vitro. Pups from knockout oocytes showed alterations in blood glucose levels in the tests of glucose intolerance and insulin resistance when compared to wild-type oocyte (WT) pups. In addition, we found alterations in mitochondria of oocyte knockout regarding number (WT = 0.061 ± 0.004 and Mfn2-null = 0.037 ± 0.003 organelle / μm^2), crests morphology, area (WT = 0.589 ± 0.015 and Mfn2-null = $1.673 \pm 0.101 \mu\text{m}^2$) and contact with RE. However, Mfn2 knockout resulted in decreased lipid content in ovulated oocytes (WT = 13.07 ± 0.96 and Mfn2-null = 9.65 ± 0.64 % of lipid-occupied area of ooplasm). In addition, no evidence was found at the transcriptional level of ER stress. As regards mitophagy, no knockout effect of Mfn2 was observed on the expression of genes involved in this pathway, as well as on co-localization between mitochondria and autophagosomes (WT = 0.65 ± 0.05 and Mfn2-null = 0.53 ± 0.04 AU). Thus, these findings demonstrate that conditional knockout of Mfn2 in the oocyte results in metabolic changes in offspring, most likely due to changes in morphology, function and contact between mitochondria and ER. However, the molecular mechanism by which this occurs still lacks elucidation. Furthermore, we have demonstrated that conditional knockout of Mfn2 can be a good model for the study of the inheritance of metabolic syndromes.

Key words: oocyte, mitofusin 2, mitochondria, endoplasmic reticulum and metabolic syndrome.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	3
A mitocôndria.....	3
Genética Mitocondrial.....	3
Herança Mitocondrial.....	4
Dinâmica mitocondrial.....	6
Fusão Mitocondrial.....	8
MFN2 e o retículo endoplasmático.....	11
MFN2, mitofagia e envelhecimento.....	13
MFN2 e o metabolismo energético.....	15
Metabolismo lipídico em oócitos.....	17
MFN2 e o oócito.....	19
HIPÓTESE.....	22
OBJETIVOS.....	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos.....	24
PLANO DE TRABALHO.....	26
MATERIAL E MÉTODO.....	29
Manutenção dos animais.....	29
Genotipagens.....	29
Coleta de oócitos imaturos (GV).....	30
Maturação in vitro (MIV).....	30
Coleta oócitos ovulados.....	31
Análise do $\Delta\Psi_m$	31
Microscopia de fluorescência.....	31
Análise de gotas lipídicas.....	32
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	32
Análise da expressão gênica por qPCR.....	33
Teste de tolerância á glicose e resistência á insulina (GTT e ITT).....	35
Ganho de peso.....	35
Análise de dados.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
Validação do modelo.....	38
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> não resulta em alterações na competência oocitária.....	38
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> resulta em síndrome metabólica na progênie.....	40
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> resulta em alterações nas mitocôndrias oocitárias.....	42
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> não resulta em stress do ER.....	48
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> não resulta em alterações na via mitofágica.....	51
O <i>knockout</i> condicional do <i>Mfn2</i> resulta em alterações no contingente lipídico.....	53
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O oócito é, dentre todas as células de um organismo, a que possui maior quantidade de mitocôndrias e DNA mitocondrial (mtDNA) (SHOUBRIDGE e WAI, 2007). Isso sugere que a mitocôndria desempenha um papel chave na oogênese, mesmo que grande parte da energia necessária durante esse período seja provida pelas células do cumulus (COLLADO-FERNANDEZ *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2009). Sendo assim, as mitocôndrias oocitárias são importantes para garantir a competência de desenvolvimento do oócito, principalmente durante a maturação do gameta quando as células do cumulus deixam de complementar as demandas energéticas do oócito (COLLADO-FERNANDEZ *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2009).

Ademais, a herança mitocondrial é exclusivamente materna. Sendo assim, a qualidade das mitocôndrias oocitárias interfere não apenas na qualidade do oócito, mas também na qualidade das mitocôndrias que irão povoar os mais diversos tecidos da progênie (WU, L. L. *et al.*, 2015; SABEN *et al.*, 2016). Por causa disso, síndromes tanto metabólicas (AIKEN *et al.*, 2016; SABEN *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2015) quanto neurodegenerativas (POULTON *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2008; WALLACE e CHALKIA, 2013) podem ter origem no gameta. Embora a contribuição mitocondrial para o desenvolvimento de doenças metabólicas ainda não esteja totalmente esclarecida, há evidências de que a qualidade mitocondrial está associada à obesidade, resistência à insulina, diabetes e doenças cardiovasculares (CRESCENZO *et al.*, 2015; KELLEY *et al.*, 2002; MONTGOMERY e TURNER, 2015).

Além disso, poucos estudos têm relacionado a herança de mitocôndrias disfuncionais com síndromes metabólicas na progênie (SABEN *et al.*, 2016). Levando-se em conta que em 2014 já existiam 422 milhões de pessoas com diabetes tipo II no mundo e que 1,6 milhões de mortes foram causadas por diabetes em 2015 e mais 2,2 milhões de mortes foram relacionadas com um alto nível de glicose no sangue, entender os mecanismos envolvidos com a herança de síndromes metabólicas tem se tornado cada vez mais importante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar a presença de síndrome metabólica na progênie oriunda de oócitos *knockout* para *Mitofusina 2 (Mfn2)*, assim como, melhor entender os mecanismos relacionados a esse efeito. Para isso, realizamos o *knockout* condicional da *Mfn2* apenas em oócitos e analisamos o efeito ocasionado na progênie quanto ao ganho de peso, metabolismo da glicose e resistência a insulina. Além disso, investigamos alguns dos possíveis mecanismos alterados no oócito (alterações mitocondriais, estresse do retículo endoplasmático (RE), acúmulo lipídico e mitofagia) que poderiam vir a explicar a causa da herança de síndrome metabólica.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

A mitocôndria

Mitocôndrias são conhecidas, sobretudo, por seu papel central na bioenergética e no metabolismo de lipídeos e aminoácidos, uma vez que abrigam a β oxidação, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa. Essas organelas oxidam as calorias oriundas da dieta com o oxigênio da respiração, gerando cerca de 90% da energia celular. A mitocôndria também está envolvida na regulação do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, na apoptose e na imunidade inata (MISHRA e CHAN, 2014; SCHREPFER e SCORRANO, 2016; WALLACE e CHALKIA, 2013).

A mitocôndria é composta por duas membranas, as quais abrigam a matriz mitocondrial e o espaço inter-membranas. Como a membrana interna apresenta maior extensão do que a externa, ela se dobra formando cristas onde se ancoram os cinco complexos (I, II, III, IV e V) da cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória. A cadeia respiratória é constituída pelos transportadores de elétrons móveis, coenzima Q e citocromo c, juntamente com os quatro complexos que realizam a oxidação do substrato para conduzir a extrusão de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço inter-membranas. Isso gera um gradiente eletroquímico (potencial de membrana; $\Delta\Psi_m$) essencial para a produção de adenosina trifosfato (ATP), uma vez que o retorno dos H^+ para a matriz, via o complexo V (ATP sintase), é utilizado como força motriz para a produção de ATP (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; WALLACE e CHALKIA, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Genética Mitocondrial

Devido à sua origem endossimbiótica, a mitocôndria contém seu próprio material genético (DNA mitocondrial ou mtDNA), o qual tem formato circular e codifica genes essenciais para a cadeia transportadora de elétrons. Uma célula somática de mamífero contém centenas de mitocôndrias e milhares de cópias de mtDNA (STEWART *et al.*, 2008). Presentes na matriz mitocondrial, as moléculas de mtDNA são organizadas num complexo núcleo-proteico denominado nucleóide. O mtDNA é uma molécula extremamente compacta, a qual em mamíferos apresenta ~16,5 kb de comprimento e codifica 37 genes, sendo 13 RNAs mensageiros (mRNAs), 2 RNAs ribossômicos (rRNAs) e 22 RNAs transportadores (tRNAs). Todos os 13 polipeptídios codificados pelo mtDNA compõem os complexos presentes na membrana mitocondrial interna, com exceção do complexo II que é composto somente por proteínas codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) e importadas pela mitocôndria (MISHRA e CHAN, 2014). Sendo assim, os complexos I, III e IV da cadeia respiratória estão sob controle genético duplo (SILVA *et al.*, 2016). O nDNA também codifica o proteoma mitocondrial necessário para a manutenção e expressão do mtDNA (FALKENBERG *et al.*, 2007), síntese proteica (RORBACH *et al.*, 2007), importação e exportação (BOLENDER *et al.*, 2008;

TATSUTA e LANGER, 2008), síntese de clusters ferro-enxofre (LILL e MÜHLENHOFF, 2008), ciclo do ácido cítrico e ureia, oxidação de ácidos graxos e vias metabólicas adicionais (SILVA *et al.*, 2016).

Uma vez que o mtDNA de mamíferos quase não contém regiões intergênicas e é destituído de íntrons, mutações neste genoma têm maiores chances de afetar a codificação proteica se comparado ao nDNA. Somado a isso, a mitocôndria constitui um dos principais sítios de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species), o que torna o mtDNA bastante propenso ao surgimento de mutações (WALLACE *et al.*, 2013). Uma mutação no mtDNA pode estar presente na totalidade de moléculas de mtDNA de uma célula, sendo esta condição denominada homoplasmia, ou pode abranger somente parte das moléculas, o que é denominado heteroplasmia (STEWART *et al.*, 2008). Uma vez que a maioria das mutações no mtDNA é recessiva, nos casos de heteroplasmia o efeito da mutação depende da porcentagem de moléculas mutantes. O efeito da mutação é ainda minimizado pelos constantes eventos de fusão e fissão mitocondrial que misturam os conteúdos das organelas, resultando no que é conhecido por complementação mitocondrial (MISHRA e CHAN, 2014).

Dado que a herança mitocondrial é exclusivamente materna, que não há recombinação homóloga entre moléculas de mtDNA e que o genoma mitocondrial está sujeito a uma elevada taxa de mutação, era esperado encontrar em mamíferos o fenômeno denominado Catraca de Muller. Esse fenômeno baseia-se no fato de que o genoma de uma população assexuada tende a acumular mutações deletérias (e.g., que resultam em disfunção mitocondrial) de forma irreversível. Apesar de esperado, esse fenômeno não é verificado, o que levanta questões sobre os mecanismos envolvidos na herança mitocondrial e que evitam tal acúmulo (STEWART e LARSSON, 2014).

Herança Mitocondrial

Em mamíferos, a frequência de um determinado haplótipo mitocondrial presente em heteroplasmia varia na prole ao redor da frequência presente na progenitora e a homoplasmia tende a ser restabelecida após poucas gerações (HAUSWIRTH e LAIPIS, 1982). Essa rápida segregação de um haplótipo é proposta como sendo devida a um mecanismo conhecido como gargalo genético mitocondrial (STEWART *et al.*, 2008; Figura 1). De acordo com este mecanismo, o mtDNA não é replicado na linhagem germinativa durante o desenvolvimento inicial, resultando em poucas dezenas de cópias nas células germinativas primordiais (PGCs). No entanto, nas fases seguintes do desenvolvimento da linhagem germinativa da fêmea o mtDNA é intensamente replicado, atingindo ~200.000 cópias no oócito maturo. Portanto, a redução de cerca de mil vezes do número de cópias de mtDNA entre a fecundação e a formação das PGCs é apontada como um dos fatores que força a segregação de moléculas de mtDNA polimórficas. Somado a isso, somente cerca de dez células das

milhares presentes no embrião dão origem às PGCs e nem todas as moléculas de mtDNA presentes nas oogônias são utilizadas como molde para a replicação do mtDNA no oócito, o que deve acentuar a segregação mitocondrial (STEWART *et al.*, 2008). No entanto, apesar da teoria do gargalo genético mitocondrial ser amplamente aceita, alguns dos seus aspectos moleculares não são bem compreendidos. Por exemplo, a mesma não explica achados mais recentes de que mutações deletérias são negativamente selecionadas na linhagem germinativa (FAN *et al.*, 2008; FREYER *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2007; SHARPLEY *et al.*, 2012; STEWART *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Stewart *et al.* (2008) mostrou de forma bastante convincente a ocorrência desse mecanismo de purificação. Neste estudo, machos de uma linhagem de camundongos portadora de uma DNA polimerase mitocondrial defeituosa (PolgA^{D257A}; KUJOTH *et al.*, 2005; TRIFUNOVIC *et al.*, 2004) foram acasalados com fêmeas selvagens com o intuito de introduzir mutações no mtDNA. Após duas gerações de retrocruzamentos, as fêmeas descendentes foram então acasaladas com machos selvagens para eliminar a mutação nuclear PolgA^{D257A} e estudar o padrão de herança das mutações introduzidas no mtDNA. Foi observada uma seleção negativa mais intensa contra mutações no mtDNA em genes codificantes de proteínas do que em genes codificantes de tRNAs e rRNAs, o que representa um claro exemplo de seleção genética. Além disso, mutações sinônimas em genes codificadores de mRNAs sofreram menor pressão de seleção do que mutações não sinônimas ou com perda de sentido (STEWART *et al.*, 2008).

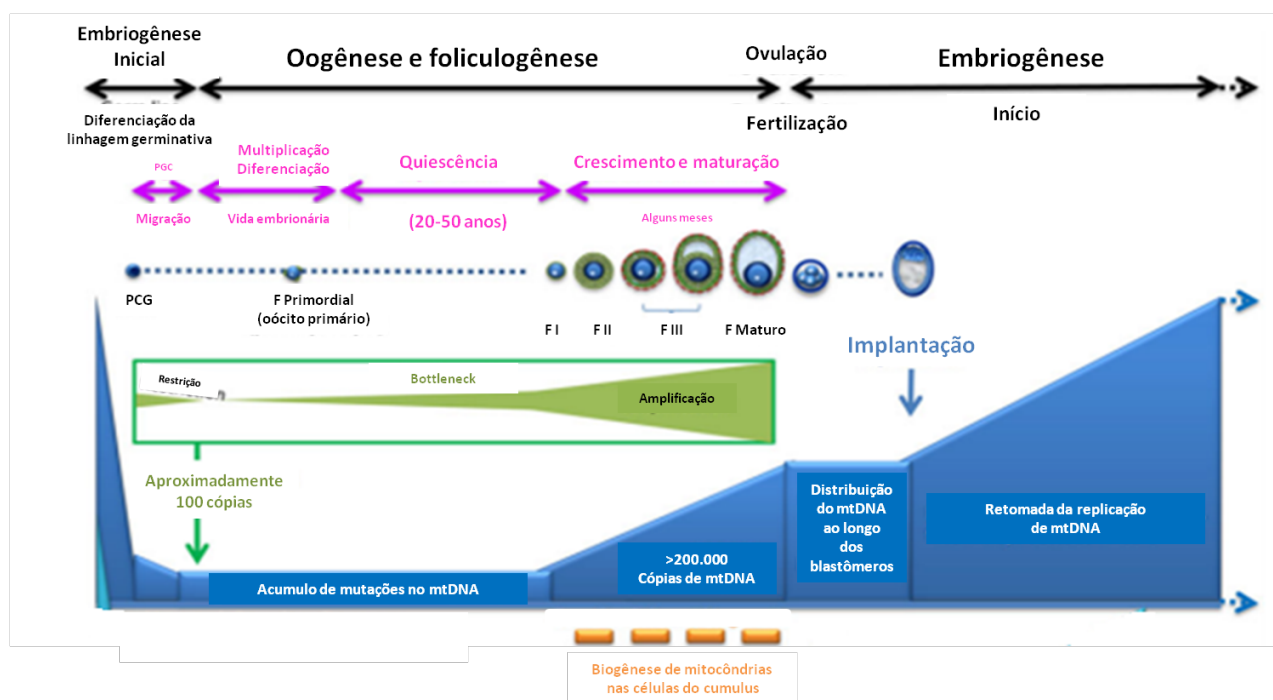


Figura 1. Biogênese mitocondrial durante a foliculogênese e o início do desenvolvimento humano. Durante a embriogênese, o conteúdo de mtDNA de cada célula do embrião diminui drasticamente. Já durante a oogênese, ocorre uma restrição e amplificação do número de cópias de mtDNA, de forma que apenas um *pool* de moléculas é multiplicado, resultando em um efeito de gargalo (em verde). Além disso, a estreita relação entre as células do granulosa e o oócito

parece ser importante para a constituição deste *pool* de mitocôndrias oocitárias. F= folículo, I= primário, II= secundário, III= terciário. Adaptado (MAY-PANLOUP *et al.*, 2016).

Essa seleção explica porque, em humanos, grande parte das mutações mitocondriais causadoras de doenças familiares é relativamente leve enquanto que as causadas por grandes deleções são esporádicas (SCHON *et al.*, 2012). Porém, pouco se sabe sobre a seleção purificadora e como esta evita que mutações deletérias sejam transmitidas. Segundo Stewart *et al.* (2008), uma possível hipótese é que a seleção ocorra a nível da organela, ou seja, organelas disfuncionais poderiam ser eliminadas, por exemplo, através de autofagia (e.g., mitofagia).

Dinâmica mitocondrial

Os processos de remodelação mitocondrial (fusão e fissão) são coletivamente denominados de dinâmica mitocondrial (PERNAS e SCORRANO, 2015). O termo “dinâmica mitocondrial” também se refere às mudanças contínuas na posição, tamanho e forma das mitocôndrias dentro das células. Em células eucariotas, as mitocôndrias estão dispostas em uma grande variedade de formas, variando de longos túbulos interconectados até esferas individuais (KONING *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2003; BEREITER-HAHN e VÖTH, 1994). A morfologia da rede mitocondrial é mantida por ciclos de fusão e fissão (SILVA *et al.*, 2016) e está diretamente associada a respostas celulares ou estágios do desenvolvimento como apoptose, resposta a fome, quimiotaxia, sinalização imune, desenvolvimento embrionário, entre outros (Figura 2). Isso revela a existência de um grande espectro de largura, comprimento, padrões de cristas e interconectividade mitocondrial.

Sendo assim, mitocôndrias são organelas dinâmicas que apresentam a capacidade de remodelar suas membranas em ciclos de fusão e fissão, o que tem efeitos diretos sobre o transporte e a bioenergética mitocondrial (MISHRA e CHAN, 2014). A fusão mitocondrial é um processo altamente conservado em todas as células eucarióticas com mitocôndrias (PERNAS e SCORRANO, 2015) e pode ser realizada em uma ou duas etapas (Figura 3). Primeiramente, ocorre a fusão das membranas externas, o que é mediado pelas GTPases MFN1 e MFN2, seguida da fusão das membranas internas, mediado pela GTPase OPA1 (*dynamin-related protein optic atrophy 1*). Já a fissão mitocondrial é fruto do estrangulamento de suas membranas, mediado pela GTPase DRP1 (*dynamin-related protein 1*). Eventos de fusão e fissão resultam na mistura do conteúdo da rede mitocondrial (e.g., mtDNA, RNAs e proteínas) e são fundamentais para a manutenção da atividade da organela e integridade do mtDNA.

A rede mitocondrial pode sofrer alterações devido a condições de estresse ou modificação do destino celular e do metabolismo, a fim de se adaptar as necessidades energéticas da célula (HYDE *et al.*, 2010; Figura 2). Já é sabido que a morfologia da rede mitocondrial varia dependendo dos substratos respiratórios (JIMENEZ *et al.*, 2014) ou glicolíticos (ROSSIGNOL *et al.*, 2004; MISHRA

et al., 2014) disponíveis. Além disso, as interconexões da rede mitocondrial aumentam em condições de fome, o que tem sido relacionado com a prevenção da degradação mitocondrial por autofagia (GOMES *et al.*, 2011; RAMBOLD *et al.*, 2011), manutenção do conteúdo de mtDNA, da heterogeneidade de nucleóides, manutenção do $\Delta\Psi_m$ e da fosforilação oxidativa (MISHRA e CHAN, 2014). Em contraste, ocorre a fragmentação da rede mitocondrial sob condições apoptóticas (FRANK *et al.*, 2001) e uma vez que esta individualiza as mitocôndrias, a fragmentação mitocondrial tem sido também relacionada com a facilitação do transporte mitocondrial e mitofagia. Sendo assim, nos últimos anos, a dinâmica mitocondrial emergiu como um aspecto chave da biologia e função mitocondrial, tendo importante papel na apoptose, autofagia, homeostase de Ca^{2+} , controle da qualidade mitocondrial, respiração e metabolismo oxidativo. Portanto, as alterações na dinâmica mitocondrial têm um profundo impacto sobre a função celular e tecidual (ARCHER, 2013; LIESA *et al.*, 2009; LIESA e SHIRIHAI, 2013). Assim como, têm sido associadas a neuropatias (Charcot-Marie-Tooth tipo 2A e neuropatia óptica hereditária dominante autossômica ou ADOA; ALEXANDER *et al.*, 2000; DELETTRE *et al.*, 2000; ZÜCHNER *et al.*, 2004), doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson e aterosclerose; CHEN *et al.*, 2004; MCCOY e COOKSON, 2012) e doenças metabólicas (obesidade e diabetes tipo 2; BACH *et al.*, 2003; SCHNEEBERGER *et al.*, 2013; SEBASTIÁN *et al.*, 2012).

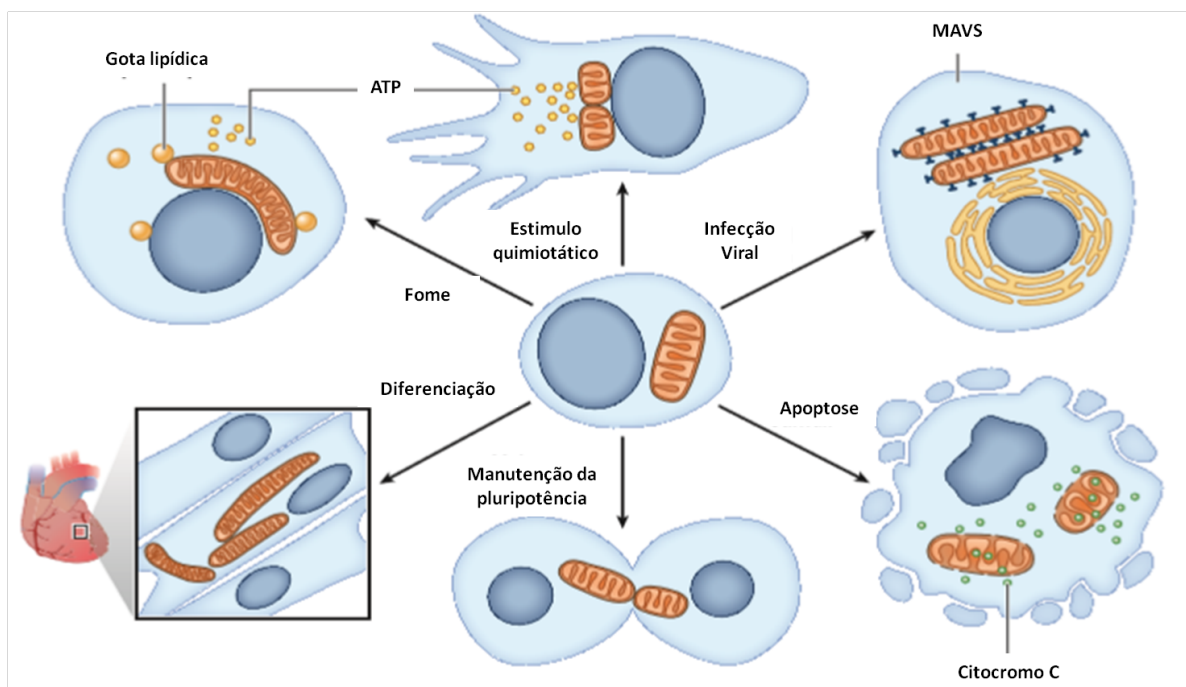


Figura 2. Mudanças na morfologia mitocondrial de acordo com as demandas celulares. As mitocôndrias são capazes de alterar sua morfologia para atender às necessidades celulares mais diversas. Durante a autofagia devido a fome, as mitocôndrias encontram-se alongadas e promovem a sobrevivência celular através do aumento da captação de substratos para a respiração, como gotas lipídicas, e da fosforilação oxidativa. Alterações morfológicas semelhantes ocorrem para garantir a sobrevivência celular durante uma infecção viral, através do estímulo das vias antivirais por aumento do contato com o retículo endoplasmático e também por vias de ativação antiviral por proteínas mitocondriais. Em contrapartida, a

fragmentação mitocondrial facilita divisões assimétricas e mantém a pluripotência, enquanto que a fusão garante a diferenciação adequada dos cardiomiócitos. A remodelação das cristas mitocondriais também é de extrema importância para a autofagia e apoptose, assim como, influencia no metabolismo. A abertura das cristas durante a apoptose resulta na liberação de moléculas pró-apoptóticas do espaço entre membranas e em morte celular. Adaptado (PERNAS e SCORRANO, 2015).

Fusão Mitocondrial

MFN1 e MFN2 são proteínas fusogênicas pertencentes a família das GTPases transmembranares (SANTEL, 2003). Essas proteínas encontram-se conservadas entre os organismos, sendo encontradas desde leveduras a humanos (MISHRA e CHAN, 2014). As mitofusinas apresentam semelhança de 64% na sequência de aminoácidos na porção GTPase N-terminal, domínio necessário para a atividade de fusão mitocondrial. Além deste domínio, as mitofusinas também possuem um domínio transmembranar necessário para a inserção na membrana mitocondrial externa e duas repetições preditas que intermedeiam o contato entre mitocôndrias adjacentes (KOSHIBA, 2004; SANTEL, 2003; ROJO *et al.*, 2002). Essas proteínas apresentam 741 e 757 aminoácidos de comprimento, respectivamente, em camundongos e humanos. Sendo assim, não devem ser vistas apenas como mediadores da fusão, mas sim como receptores multifuncionais que integram sinais citosólicos com mudanças morfológicas e funcionais da mitocôndria (PERNAS e SCORRANO, 2015). Apesar da semelhança entre as mitofusinas, MFN1 e MFN2 apresentam papéis distintos na célula. Isso se deve à interação com parceiros específicos ou moduladores de atividade, assim como, pelas formas de regulação pós-traducional a que estão sujeitos. Além disso, *Mfn1* e *Mfn2* são diferencialmente expressos nos tecidos, sendo que, *Mfn1* é preferencialmente expresso no coração, fígado, pâncreas, glândulas supra-renais e testículo, enquanto que o *Mfn2* é mais abundantemente expresso no coração, músculo esquelético, cérebro, glândulas supra-renais, e tecido adiposo marrom. Ambas as mitofusinas são responsáveis por mediar a fusão de mitocôndrias (SCHREPFER e SCORRANO, 2016), mas enquanto MFN1 parece ser mais eficiente nesta função (ISHIHARA *et al.*, 2004), MFN2 desempenha várias outras funções na célula. Além disso, MFN2 também está presente na membrana do RE, sendo responsável por regular a sua morfologia e interação com a mitocôndria. Ademais, o MFN2 está envolvido na regulação do metabolismo energético e da autofagia. Como consequência, mutações no *Mfn2* se associam com diversas patologias, incluindo doenças metabólicas (SCHREPFER e SCORRANO, 2016) e neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2007).

Além disso, as diversas morfologias que as mitocôndrias assumem, de modo tecido-específico, demonstram as suas diversas funções sob diferentes demandas. Os eventos de fusão e fissão ocorrem sem instrução nuclear ou tradução *de novo*, o que indica uma regulação autônoma da estrutura e função em resposta a sinais celulares (PERNAS e SCORRANO, 2015). A fusão é responsável pela manutenção da homogeneidade genética e bioquímica, permitindo a diluição de

ROS, mtDNA mutante e repolarização das membranas (CHAN, 2011). Isso poderia levar a crer que mitocôndrias saudáveis se fundem com mitocôndrias não saudáveis, porém, mitocôndrias disfuncionais ou despolarizadas são rapidamente direcionadas para degradação (NARENDRA e YOULE, 2011; TWIG e SHIRIHAI, 2011).

Além disso, as mitocôndrias são funcional e morfológicamente heterogêneas com base em estudos que caracterizam a morfologia, o $\Delta\Psi_m$, ensaios de liberação de Ca^{2+} , estado redox, atividade respiratória, interconectividade e interação com o RE (KUZNETSOV e MARGREITER, 2009). Ao invés das mitocôndrias selecionarem ativamente outras mitocôndrias para ocorrência da fusão, acredita-se que o ambiente citoplasmático é o determinante chave destes eventos, integrando as necessidades celulares à função mitocondrial. Embora não haja dúvida de que a fusão é necessária para a atividade mitocondrial e celular (CHEN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2010, CHEN *et al.*, 2003), o papel-chave da fusão é sintonizar o estado da célula com a função mitocondrial.

O meio citosólico pode inibir ou ativar a fusão por meio de proteínas ou solutos. Por exemplo, a inibição da fusão pode ser ditada por eventos de ubiquitinação que levam à degradação proteossômica (LEBOUCHER *et al.*, 2012; CHAN *et al.*, 2011), eventos de fosforilação (PYAKUREL *et al.*, 2015) e interação com reguladores negativos (EURA *et al.*, 2006). Alternativamente, a ativação pode ser imposta por sinais externos, incluindo glutatona oxidada e proteínas citosólicas fosforiladas (PERNAS e SCORRANO, 2015).

Apesar do contato entre mitocôndrias ser indispensável para a fusão mitocondrial (Figura 3), apenas 20% dos contatos entre mitocôndrias resultam em fusão (CAGALINEC *et al.*, 2013). Isso leva a crer que o contato mitocondrial apresenta outras funções que não o desencadeamento da fusão. Ambas as mitofusinas apresentam importante papel na fusão mitocondrial (Figura 3). Mas, dependendo do tipo celular, a associação em *cis* entre elas é suficiente para evitar a ocorrência de graves disfunções celulares (CHEN *et al.*, 2003, 2005; MISHRA e CHAN, 2014). Porém, o nocaute de *Mfn1* ou *Mfn2* em embriões de camundongos resulta em bloqueio do desenvolvimento no dia 11 pós-coito, ressaltando também a importância da associação em *trans* entre as mitofusinas. Já o duplo nocaute de *Mfn1* e *Mfn2* é ainda mais severo, cessando o desenvolvimento no dia 8,5 (CHEN *et al.*, 2003).

Diferentemente do MFN1, o MFN2 parece desempenhar funções alternativas na célula, estando envolvido na regulação do metabolismo energético (ZORZANO *et al.*, 2015), no transporte mitocondrial (NI *et al.*, 2015), na atração de PARKIN para mitocôndrias disfuncionais (CHEN e DORN, 2013), na regulação da forma e função do RE (SCHREPFER e SCORRANO, 2016) e no *tethering* entre mitocôndrias e o RE (DE BRITO e SCORRANO, 2008) ou gotas lipídicas (WASILEWSKI *et al.*, 2012; BOUTANT *et al.*, 2017). A divergência funcional entre MFN1 e MFN2 é ainda suportada por estudos *in vivo* em camundongos, os quais mostram que o MFN2 é necessário

para a homeostase normal da glicose (SEBASTIÁN *et al.*, 2012), para a esteroidogênese (WASILEWSKI *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2012), para o desenvolvimento cerebelar (CHEN *et al.*, 2007) e para a função e manutenção de projeções axonais de neurônios dopaminérgicos (LEE *et al.*, 2012; PHAM *et al.*, 2012). Além disso, o impacto bioenergético causado pela perda de MFN2 é pleiotrópico e tecido específico. Em células de Purkinje, neurônios dopaminérgicos e músculo esquelético, a perda de MFN2 está associada a uma perda de atividade do complexo IV (CHEN *et al.*, 2007; SEBASTIÁN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012). Porém, a perda de MFN2 no fígado apenas prejudica suavemente as atividades dos pares de complexos I-II e II-III (SEBASTIÁN *et al.*, 2012). Já a perda de MFN1 ou MFN2 no coração está associada a uma ligeira disfunção da fosforilação oxidativa que não pode ser explicada por níveis reduzidos dos complexos de proteínas ou pela perda de suas atividades enzimáticas (PAPANICOLAOU *et al.*, 2011; PAPANICOLAOU *et al.*, 2012). Ainda, a perda de MFN2 no coração tem sido relacionada com a proteção das mitocôndrias quanto á abertura de poros de transição de permeabilidade (mPTP) induzida por Ca^{2+} (PAPANICOLAOU *et al.*, 2011). Muitos estudos mostram ainda que os defeitos bioenergéticos mitocondriais observados na ausência de MFN2 não podem ser atribuídos a uma perda acentuada de subunidades da cadeia transportadora de elétrons ou níveis reduzidos de mtDNA (SEBASTIÁN *et al.*, 2012; LOISEAU *et al.*, 2007; MOURIER *et al.*, 2015).

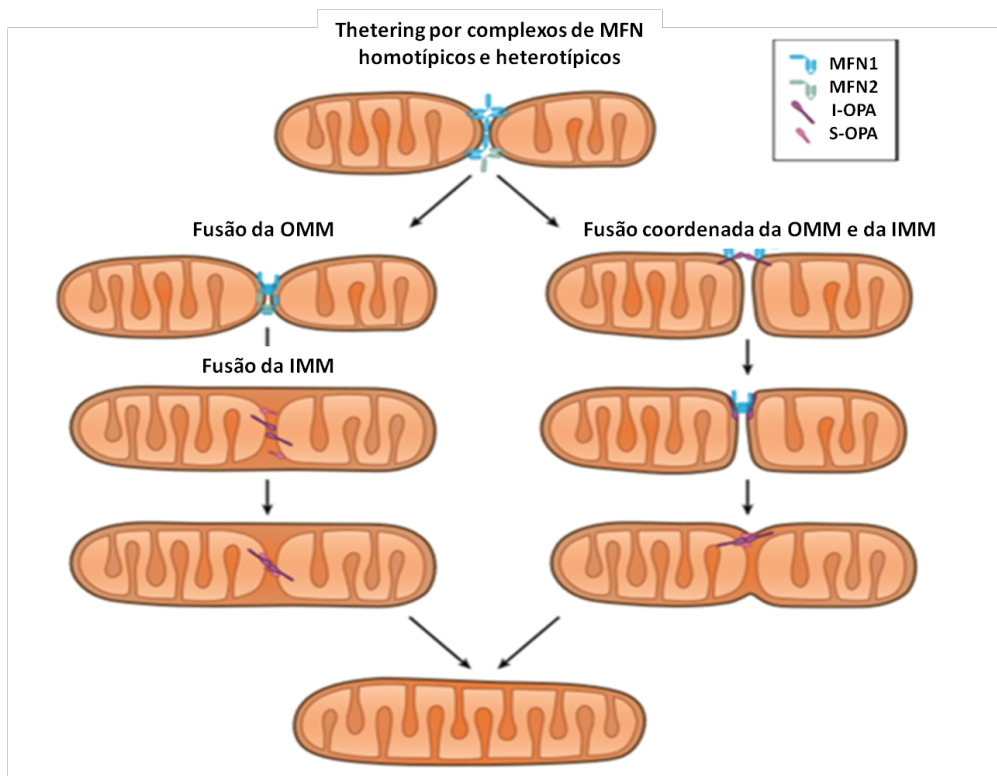


Figura 3. Fusão da membrana mitocondrial externa e interna. Representação esquemática do contato entre duas mitocôndrias através de interações homotípicas (MFN1-MFN1 e MFN2-MFN2) ou heterotípicas (MFN1-MFN2). Após o contato, a fusão da membrana externa pode ocorrer em um passo distinto ou não da fusão da membrana interna. O evento de fusão resulta na mistura do conteúdo de mtDNA. IMM= membrana mitocondrial interna, L-OPA1 = isoformas

longas de OPA1, MFN = mitofusina, MFN1 = mitofusina 1, MFN2 = mitofusina 2, OMM = membrana mitocondrial externa, S-OPA1 = isoformas curtas de OPA1. Adaptado (PERNAS e SCORRANO, 2015).

A modulação da expressão de *Mfn2* *in vitro* e *in vivo* demonstrou uma estreita ligação entre MFN2, respiração celular e metabolismo. A repressão de *Mfn2* resultou em diminuição do consumo de oxigênio, diminuição da oxidação de glicose e ácidos graxos, e diminuição do $\Delta\Psi_m$ em vários modelos e tecidos celulares (BACH *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005; PICH *et al.*, 2005; SEBASTIÁN *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, o *Mfn2* parece ser regulado por transcrição. Além disso, o MFN2 também é regulado pela atividade proteossômica após ubiquitinação. Já o estresse oxidativo celular sabidamente induz a expressão de *Mfn2* em miócitos cardíacos (NIE *et al.*, 2014) e melhora a fusão mitocondrial em células HeLa (SHUTT *et al.*, 2012).

MFN2 e o retículo endoplasmático

É no RE que ocorre a síntese, dobramento e transporte de proteínas secretórias e de membrana. O RE também desempenha papel fundamental no armazenamento de Ca^{2+} e na biossíntese de lipídeos (ROWLAND e VOELTZ, 2012). Além disso, é sabido que esta organela não é isolada, mas apresenta locais de contato com outras organelas citoplasmáticas (ROWLAND e VOELTZ, 2012). Dentre esses, o contato com a membrana mitocondrial externa (Figura 4) é um dos mais bem caracterizados (denominado MAM, *mitochondrial-associated membranes*), sendo de grande importância na regulação do metabolismo lipídico e na sinalização por Ca^{2+} (ZORZANO *et al.*, 2015). A justa posição das membranas do RE e da mitocôndria é principalmente promovida por MFN2, o qual também está presente na membrana do retículo RE (ZORZANO *et al.*, 2015; DE BRITO e SCORRANO, 2008). Uma vez que a MAM é rica em receptores de liberação de Ca^{2+} do RE (receptores inositol 1,4,5-trifosfato - IP₃R1) e transportadores de Ca^{2+} mitocondriais (VDAC), o MFN2 atua na manutenção da bioenergética mitocondrial, na regulação da homeostase do Ca^{2+} mitocondrial e na indução da apoptose (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; ZORZANO *et al.*, 2015).

Além disso, não apenas a membrana da mitocôndria supre a formação dos autofagossomos na fome (HAILEY *et al.*, 2010), mas também é nas regiões de contato entre RE e mitocôndrias que se formam os autofagossomos (HAMASAKI *et al.*, 2013; GELMETTI *et al.*, 2017). Hamasaki *et al.* (2013) descobriram que na ausência de MFN2 ocorre uma inibição da co-localização de ATG14 (*Autophagy Related 14*) e DFC1 (*double FYVE domain-containing protein 1*) nas MAMs e isto evita a formação dos autofagossomos. Além disso, a fusão destes com lisossomos (ZHAO *et al.*, 2012) também é afetada na ausência de MFN2, o que está estritamente associado com a ocorrência de mitofagia e lipofagia (e.g., autofagia de gotículas lipídicas; DONG e CZAJA, 2011; NI *et al.*, 2015).

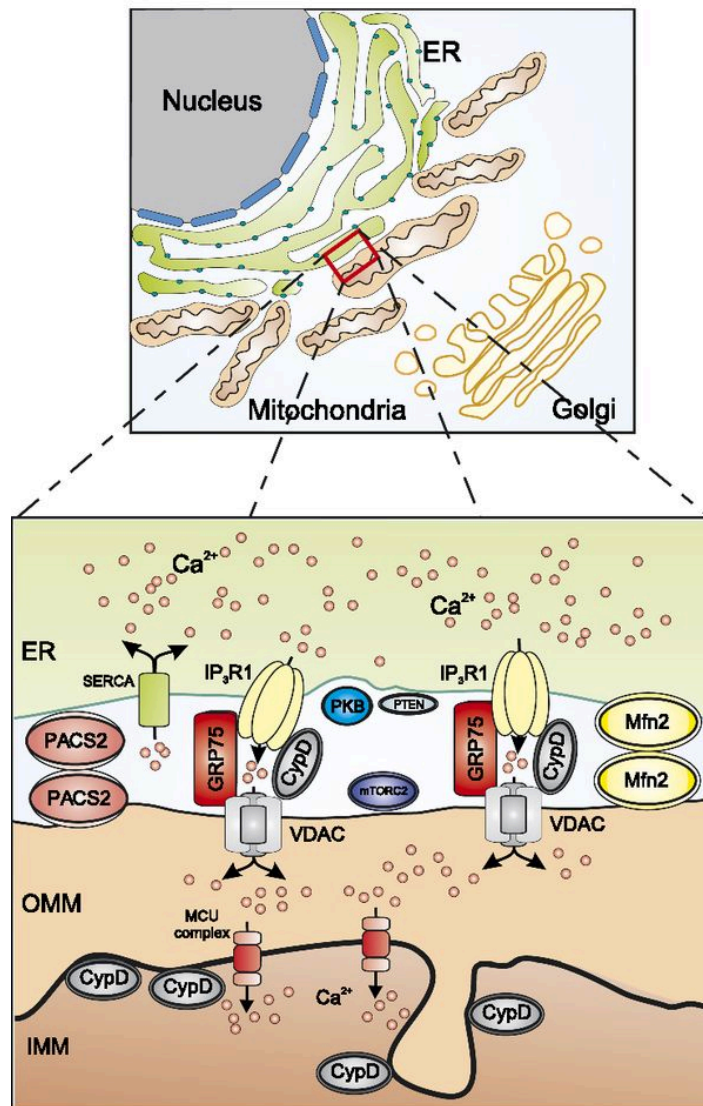


Figura 4. A integridade da MAM é necessária para a correta passagem do Ca^{2+} do retículo endoplasmático para a mitocôndria. CypD = *cyclophilin D*; IMM = membrana mitocondrial interna; MCU = *mitochondrial Ca²⁺ uniporter*; OMM = membrana mitocondrial externa; P = *phosphorylated*; PACS2 = *phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*; PTEN = *phosphatase and tensin homolog*; SERCA = *sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase*. Adaptado (RUTTER e PINTON, 2014).

O estresse do RE é desencadeado devido a uma variedade de estímulos que levam a uma série de alterações do RE, tais como homeostasia redox desregulada, o dobramento anormal de proteínas e a redução dos níveis de Ca^{2+} (MUNOZ *et al.*, 2014). Patologias como neurodegenerações, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares estão associadas com a ocorrência de estresse do RE (HOTAMISLIGIL, 2010). Pelo menos três proteínas localizadas na membrana do RE (PERK - *ER stress-activated eIF2 α kinase*, IRE-1 - *kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1* e ATF6 - *Activating Transcription Factor 6*) respondem ao estímulo de estresse, desencadeando a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR; MUNOZ *et al.*, 2014). O fator de transcrição *Atf6* encontra-se aumentado durante o estresse RE, sendo o Ca^{2+} também um importante regulador deste evento (XU *et al.*, 2004). O ATF6 induz a transcrição de *Xbp-1* (*X-box binding protein 1*) e de chaperonas, e participa na sobrevivência celular (SCHEWE e AGUIRRE-GHISO, 2008).

É sabido que a deficiência de MFN2 aumenta a taxa de marcadores da UPR no fígado, no músculo esquelético e em células cultivadas (NGOH *et al.*, 2012; SEBASTIÁN *et al.*, 2012), e o tratamento do estresse com ácido tauroursodeoxicólico (uma chaperona sintética) melhora a sinalização deficiente em insulina em células hepáticas de camundongos *Mfn2* nocaute (SEBASTIÁN *et al.*, 2012). MFN2 foi também relacionado com a regulação de PERK em fibroblastos fetais murinos (MEFs), sendo necessário para a ativação normal da apoptose e autofagia durante a resposta ao estresse do RE (MUNOZ *et al.*, 2014). Segundo Muñoz *et al.* (2014), a deficiência de MFN2 causa disfunção mitocondrial justamente pela ativação sustentada de PERK nas MEFs, sendo assim, este mecanismo relacionado ao RE seria o responsável pelo desenvolvimento de mitocôndrias inchadas, sobrecarga de Ca^{2+} , assim como, o aumentado da produção de ROS e redução da respiração mitocondrial em células deficientes em MFN2. A inativação de PERK por MFN2 se daria em condições basais e o nocaute de *Mfn2* resulta em ativação sustentada de PERK no músculo esquelético, fígado e células pré-adiposas. Portanto, a ativação de PERK na ausência de MFN2 pode não ser tecido específico. Ainda, a interação mediada pelo MFN2 do RE com mitocôndrias é crucial para a homeostase metabólica e para a regulação da vida e morte celular. Dessa forma, MFN2 parece integrar também o estado celular com a resposta ao estresse do RE (MUNOZ *et al.*, 2014).

MFN2, mitofagia e envelhecimento

Em modelos somáticos de cultivo celular, a mitofagia tem se apresentado como um promissor mecanismo de eliminação de mitocôndrias disfuncionais. Segundo Mishra e Chan (2014), mitofagia é uma forma seletiva de autofagia que envolve o “sequestro” de mitocôndrias por autofagossomos e posterior degradação nos lisossomos. Acredita-se que esse mecanismo é o principal responsável pela degradação de mitocôndrias disfuncionais, e assim, mantém a qualidade da população mitocondrial. Mitocôndrias experimentalmente despolarizadas por tratamento com CCCP (cianeto de carbonila de meta-clorofenilhidrazona) atraem mais facilmente a maquinaria necessária para a autofagia (NARENDRA *et al.*, 2008; NI *et al.*, 2015; YOULE e NARENDRA, 2011), o que confirma a importância desse processo na eliminação de mitocôndrias disfuncionais (SONG *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que mutações no mtDNA também podem ser seletivamente eliminadas por mitofagia em células cultivadas. No entanto, a eliminação neste caso foi dependente do tratamento com rapamicina (DAI *et al.*, 2014; GILKERSON *et al.*, 2012) ou superexpressão de *Parkin* (ou *Park 2 - Parkinson's disease (autosomal recessive, juvenile) 2*), uma das proteínas envolvidas na via mitofágica (SUEN *et al.*, 2010). Além disso, estudos recentes indicam que o envelhecimento está relacionado com deficiência na via mitofágica em *C. elegans*, o que pode explicar o acúmulo de mitocôndrias danificadas dependente da idade (PALIKARAS *et al.*, 2015). No entanto, ainda não

está claro se os danos mitocondriais são uma causa ou a consequência do envelhecimento (BRATIC e LARSSON, 2013).

A via mais estudada de regulação mitofágica está relacionada com as proteínas PINK1 (*PTEN-induced putative kinase protein 1*) e PARKIN, cujas mutações em genes que as codificam estão relacionadas com formas herdáveis da doença de Parkinson (SCARFFE *et al.*, 2014). Em condições normais, o complexo TIM (*Translocase of inner mitochondrial membrane*) / TOM (*Translocase of outer mitochondrial membrane*) constantemente importa PINK1 para as mitocôndrias. Após sua importação, PINK1 sofre um processamento proteolítico (JIN *et al.*, 2010) e sai da mitocôndria para degradação (YAMANO e YOULE, 2013). Porém, a perda do $\Delta\Psi_m$ inibe a importação de PINK1 e a clivagem proteolítica, levando à inserção do seu domínio transmembranar na membrana mitocondrial externa (NARENDRA *et al.*, 2010; NARENDRA *et al.*, 2008). PINK1 fosforila a ubiquitina (Ub) presente em proteínas mitocondriais, incluindo a MFN2. As ubiquitinas fosforiladas (p-Ub) recrutam PARKIN para as mitocôndrias danificadas (KANE *et al.*, 2014; KOYANO *et al.*, 2014; OKATSU *et al.*, 2015; CHEN e DORN, 2013) e a ligação deste com as pSer65-Ub libera o domínio ubiquitina de PARKIN e permite a sua fosforilação por PINK1 (SHIBA-FUKUSHIMA *et al.*, 2012; KONDAPALLI *et al.*, 2012; Figura 5). Isso leva a ativação de PARKIN, que subsequentemente ubiquitina outras proteínas da membrana mitocondrial externa, seguido da fosforilação por PINK1. A poli-ubiquitinação dessas proteínas atrai outros complexos como a histona deacetilase 6 (HDAC6) e o sequestrador 1 (P62/SQSTM1). Esses complexos interagem com os domínios de poli-ubiquitinação mitocondrial e com componentes dos autofagossomos. Em especial, HDAC6 e P62/SQSTM1 interagem com a forma lipídica de MAP1LC3b (LC3b), o qual está localizado na membrana dos autofagossomos (LC3-I) e sofre lipidação (LC3-II) em resposta ao sinal autofágico. Como resultado, autofagossomos são atraídos para a mitocôndria, levando ao seu engolfamento e posterior catabolismo nos lisossomos (NI *et al.*, 2015).

A autofagia é essencial para a manutenção da massa e da função do músculo esquelético, bem como a homeostase energética de todo o corpo (MASIERO *et al.*, 2009; MASIERO e SANDRI, 2010). Além disso, a autofagia é reduzida durante o envelhecimento (SALMINEN e KAARNIRANTA, 2009; CARNIO *et al.*, 2014), explicando um possível envolvimento no acúmulo de dano tecidual devido a idade (KROEMER, 2015). A análise do fluxo autofágico em células musculares sugere que a autofagia seletiva é mais afetada pela deficiência de MFN2 do que a autofagia geral não seletiva (também conhecida por macroautofagia). Uma menor expressão da proteína MFN2 também tem sido relacionada com o envelhecimento no músculo esquelético, e camundongos jovens *Mfn2* nocaute apresentam fenótipo precoce de alterações metabólicas e de sarcopenia, devido principalmente a defeitos autofágicos. Além disso, o peso corporal desses animais

nocaute é maior, devido a um aumento na adiposidade, sem alterações no peso do fígado, coração, cérebro ou consumo alimentar (SEBASTIÁN *et al.*, 2016).

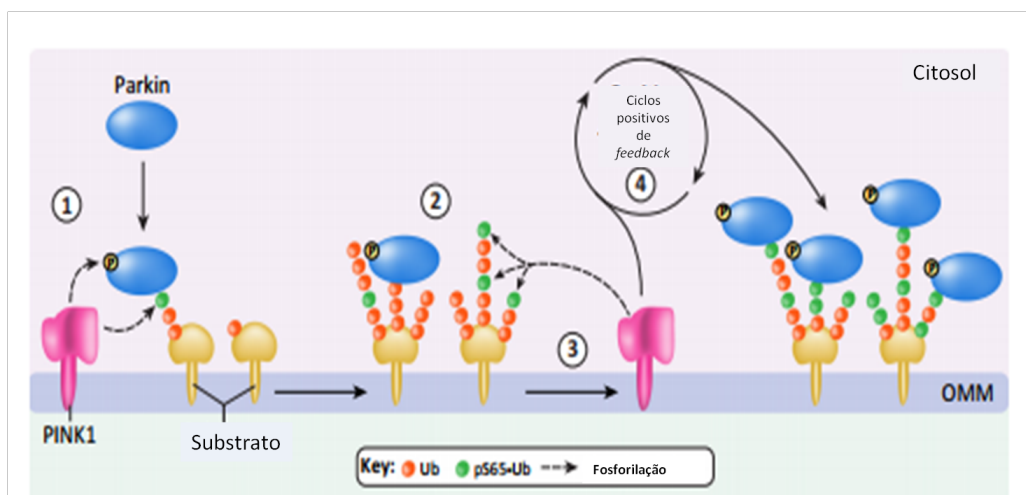


Figura 5. Ciclos de feedback positivos resultam no recrutamento e ativação de PARKIN. PINK1 medeia a fosforilação das ubiquitinas presentes nas proteínas ligadas à membrana mitocondrial externa. Isso leva ao recrutamento de PARKIN, que é fosforilado também por PINK1 de forma a ativá-lo. PARKIN ativado ubiquitina outras proteínas da membrana mitocondrial externa, o que gera mais substrato para PINK1. Isso por sua vez, recruta e ativa mais moléculas de PARKIN. Este ciclo de *feedback* continuado resulta em uma rápida amplificação do sinal que leva ao englobamento da mitocôndria pelo autofagossomo. Adaptado (NGUYEN *et al.*, 2016).

Os efeitos do envelhecimento sobre as mitocôndrias dos oócitos têm sido observados através de anormalidades morfológicas e funcionais. De fato, o inchaço mitocondrial, a vacuolização e a alteração das cristas em oócitos têm sido relacionados com o aumento da idade em humanos (VAN BLERKOM, 2011) e em roedores (KUSHNIR *et al.*, 2012; SIMSEK-DURAN *et al.*, 2013). O $\Delta\Psi_m$ no oócito também parece estar alterado com o envelhecimento em humanos (WILDING *et al.*, 2001) e em camundongos (BEN-MEIR *et al.*, 2015), assim como a produção de ATP em camundongos (BEN-MEIR *et al.*, 2015). Além disso, a disfunção mitocondrial em oócitos de camundongos idosos resulta em anormalidades do fuso meiótico (ZHANG *et al.*, 2006), ocasionando aneuploidias e anormalidades cromossômicas (MELDRUM *et al.*, 2016).

MFN2 e o metabolismo energético

Evidências recentes têm mostrado que a célula é capaz de moldar a arquitetura mitocondrial em função do balanço entre demanda e disponibilidade de energia (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; ZORZANO *et al.*, 2015). Sob condição de abundância de nutrientes, a rede mitocondrial se fragmenta, minimizando a produção de ATP, favorecendo o desacoplamento mitocondrial e estimulando o acúmulo de reservas energéticas, de modo a evitar o gasto energético desnecessário e o efeito detrimental do excesso de nutrientes (e.g., elevada geração de ROS). Por outro lado, sob condição de escassez de nutrientes, as mitocôndrias se alongam, o que favorece o uso de reservas energéticas (e.g., gotas lipídicas) e uma maior eficiência bioenergética, de modo a adequar o

metabolismo à disponibilidade de nutrientes. O alongamento mitocondrial também previne a destruição de mitocôndrias por aumento da macroautofagia como fonte energética em casos de escassez prolongada de nutrientes.

Neste contexto, o MFN2 é descrito como um potente modulador do metabolismo mitocondrial, o qual tem sua expressão fortemente regulada no músculo, no fígado e nos neurônios hipotalâmicos. Fatores como ingestão de alimentos, disponibilidade de lipídeos, citocinas pró-inflamatórias e glucocorticóides regulam negativamente a expressão do *Mfn2*, resultando em disfunção mitocondrial, aumento da geração de ROS, acúmulo citoplasmático de intermediários lipídicos e ativação da JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Ainda, a repressão da expressão do *Mfn2* pode desencadear estresse do RE, culminando no desenvolvimento de síndromes metabólicas como obesidade e diabetes. Isso pode ser verificado em pacientes obesos ou diabéticos em que a redução da expressão do *Mfn2* é diretamente proporcional a sensibilidade destes à insulina. Semelhantemente, camundongos que não expressam *Mfn2* no músculo esquelético, no fígado ou em neurônios hipotalâmicos apresentam disfunção mitocondrial, excessiva geração de ROS, estresse do RE, resistência à insulina e gliconeogênese hepática aumentada. Em modelos celulares, a depleção de *Mfn2* também resulta em disfunção mitocondrial e estresse do RE, fornecendo evidências de que MFN2 desempenha papel-chave no controle da homeostase metabólica (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; ZORZANO *et al.*, 2015).

Já é sabido que MFN2 nos neurônios POMC (pró-opiomelanocortin) está envolvido na resistência à leptina, uma condição característica da obesidade (SCHNEEBERGER *et al.*, 2013). Além disso, existe uma relação linear negativa entre os níveis de mRNA de *Mfn2* no músculo esquelético e o IMC (índice de massa corporal) de roedores e humanos (BACH *et al.*, 2003). Também foi encontrada no músculo esquelético de animais obesos uma rede mitocondrial fragmentada, associada à oxidação de nutrientes e defeitos na cadeia respiratória, bem como à resistência à insulina (KELLEY *et al.*, 2002; BACH *et al.*, 2005). Todavia, esse fenômeno é reversível, uma vez que a perda de peso ou a realização de exercício agudo, reverte o fenótipo de sensibilidade a insulina e aumenta a expressão de *Mfn2* no músculo esquelético (CARTONI *et al.*, 2005; MINGRONE *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2006).

Ademais, uma dieta rica em lipídeos (HFD – *high fat diet*) também foi relacionada com a diminuição de MFN2 hepático juntamente com o surgimento do fenótipo de resistência à insulina e estresse oxidativo (LIONETTI *et al.*, 2014). No músculo esquelético, a ausência de MFN2 leva à redução da respiração mitocondrial e ao aumento do estresse oxidativo, o que resulta em inibição da sinalização da insulina. Camundongos *Mfn2* nocaute quando alimentados com HFD demonstram intolerância à glicose e maior resistência à insulina, o que destaca a importância do MFN2 na manutenção do metabolismo muscular normal (SEBASTIÁN *et al.*, 2012).

No entanto, ao contrário do que é visto em casos de obesidade, o exercício não melhora as anormalidades na biogênese mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 2 de início precoce, devido a alterações na via regulatória que controla a expressão de PGC1 α e indução de *Mfn2* (HERNANDEZ-ALVAREZ *et al.*, 2010). Todavia, a superexpressão de *Mfn2* melhora significativamente a sensibilidade à insulina (NIE *et al.*, 2014). Além disso, uma vez que a integridade da MAM é necessária para a correta sinalização dependente de MAM e que o MFN2 altera essa integridade (DE BRITO e SCORRANO, 2008), o MFN2 pode ser um alvo potencial para modular o metabolismo celular em patologias de resistência à insulina (TUBBS *et al.*, 2014).

Metabolismo lipídico em oócitos

Durante a oogênese, o oócito em formação passa por uma série de processos biológicos de modo a ganhar competência para ser fecundado e dar suporte para a embriogênese inicial e desenvolvimento de um indivíduo saudável. O oócito interage intimamente com as células somáticas que o circundam, e juntos constituem a unidade funcional do ovário – o folículo. Ao nascimento, todos os folículos encontram-se no estágio primordial, caracterizado pela presença de um oócito não crescido e circundado por uma única camada de células somáticas da pré-granulosa. A divisão meiótica no oócito inicia-se ainda durante o período fetal e nos folículos primordiais encontra-se estagnada em diplóteno da prófase I. Em murinos, alguns dias após o nascimento um conjunto de folículos inicia o desenvolvimento, o qual se caracteriza pela proliferação das células da granulosa e crescimento do oócito. Nos folículos terciários, devido a formação da cavidade antral, as células da granulosa se dividem em cumulus (que circundam o oócito) e murais da granulosa (que ocupam a camada mais externa do folículo). Nesta fase, a expressão de receptores específicos nas células da granulosa é essencial para integrar sinais endócrinos de origem no eixo hipotálamo-hipófise com o desenvolvimento folicular e do oócito. Em especial, o nível sérico do hormônio folículo estimulante (FSH) passa a ser determinante para o desenvolvimento folicular com a formação do antro. Mais próximo da ovulação, outro hormônio que desempenha papel essencial na foliculogênese é o hormônio luteinizante (LH). Em decorrência da diminuição sérica dos níveis de FSH e aumento dos níveis de LH, o oócito inicia a fase de maturação que é caracterizada principalmente pela retomada da divisão meiótica até o estágio de metáfase II (DUNNING *et al.*, 2014). Ainda, diversas alterações são observadas no citoplasma do oócito, as quais são coletivamente denominadas de maturação citoplasmática. O processo de maturação oocitária demanda grande aporte energético, maior do que em estágios anteriores da foliculogênese, e garante a viabilidade do oócito para ser fecundado e iniciar o desenvolvimento embrionário.

Ao conjunto oócito-células do cumulus é dado o nome de complexo cumulus-oócito (COC) e esta estrutura é essencial para o desenvolvimento normal do oócito. Dado que o oócito é deficiente

para realização de glicólise, ele secreta fatores que estimulam as células do cumulus a realizarem glicólise e suprirem o gameta com piruvato, lactato e ATP, que posteriormente são utilizados pelas mitocôndrias oocitárias (GARDNER e LEESE, 1990; LEESE e BARTON, 1985; SAITO *et al.*, 1994).

A oxidação de uma única molécula de glicose via glicólise produz aproximadamente 30 moléculas de ATP que podem ser utilizadas pelo COC ou embrião como fonte de energia. Alternativamente, a oxidação de uma única molécula de ácido graxo, por exemplo o palmitato, pode produzir 106 moléculas de ATP. Portanto, existe um potencial benéfico para COCs e embriões realizarem a oxidação de ácidos graxos (FAO). A oxidação de ácidos graxos é um componente crítico do metabolismo celular, embora tenha sido conduzida uma investigação limitada sobre a importância da oxidação de ácidos graxos no COC durante a maturação do oócito (PACZKOWSKI *et al.*, 2013). A utilidade da oxidação de ácidos graxos para a produção de energia depende do transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias, que é catalizada pela carnitina palmitol transferase 1 (CPT1). A presença de substratos de ácidos graxos, como os ácidos palmítico e oléico, aumenta a abundância de transcritos de *Cpt1*, que liga os ácidos graxos à carnitina e permite seu transporte através da membrana mitocondrial (ASSIMACOPOULOS-JEANNET *et al.*, 1997). A carnitina é então removida por CPT2 e o ácido graxo sofre β -oxidação para produzir ATP (MCGARRY e BROWN, 1997). A abundância de transcritos de *Cpt1* aumenta nos COCs murinos durante a maturação, resultando em um aumento da oxidação de ácidos graxos para auxiliar na demanda metabólica do oócito durante a maturação (DUNNING *et al.*, 2010). Além disso, a inibição de CPT1b durante a maturação diminui o desenvolvimento a blastocisto (DUNNING *et al.*, 2010), indicando que a oxidação de ácidos graxos durante a maturação do oócito é essencial para a competência dos oócitos e o subsequente desenvolvimento embrionário (PACZKOWSKI *et al.*, 2013).

A diminuição da abundância de CPT1 prejudica o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias, resultando em diminuição da β -oxidação. Além disso, a produção de ATP e o consumo de oxigênio diminuem e o estresse oxidativo e a atividade glicolítica aumentam após a inibição da oxidação de ácidos graxos via etomoxir em células de glioblastoma humano (PIKE *et al.*, 2011). O aumento do metabolismo da glicose também é observado em embriões suínos após a inibição da oxidação de ácidos graxos, sugerindo que as vias de energia alternativas são aumentadas quando a oxidação de ácidos graxos está bloqueada (STURMEY *et al.*, 2009). A taxa relativa da oxidação de ácidos graxos pode ser estimulada pela suplementação de meio de cultura com carnitina, um substrato limitante de CPT1. A carnitina exógena afeta positivamente a maturação nuclear e o desenvolvimento pré-implantação quando fornecido durante a maturação do oocitária (DUNNING *et al.*, 2010). Além disso, a suplementação de carnitina durante o desenvolvimento folicular e maturação oocitária aumentam a porcentagem de oócitos que atingem o estágio de metáfase II (MII; DOWNS *et al.*, 2009;

RUDERMAN *et al.*, 2003). Apesar da oxidação de ácidos graxos ser essencial para a maturação de oócitos de camundongos, estes apresentam perturbações menores na expressão gênica, consumo de glicose, teor de lipídeos e razão ADP/ATP após a exposição dos COCs a uma dose não inibitória de etomoxir quando comparado com os COCs suínos e bovinos (PACZKOWSKI *et al.*, 2013).

MFN2 e o oócito

Tanto a quantidade de mtDNA quanto a de mitocôndrias aumenta durante a foliculogênese (WAI *et al.*, 2008; JANSEN e DE BOER, 1998), resultando num processo que pode ser denominado “meiose mitocondrial” (POULTON *et al.*, 2010). No entanto, qual a finalidade deste processo? Na tentativa de responder a esta pergunta, Udagawa *et al.* (2014) nocautearam a GTPase DRP1 exclusivamente nos oócitos durante a oogênese e observaram que o nocaute da fissão resulta em alongação mitocondrial. Este achado sugere que a fragmentação mitocondrial observada nos oócitos não é devida a repressão da expressão de GTPases de fusão como MFN1, MFN2 ou OPA1, mas provavelmente devido a excessivos eventos de fissão em relação aos eventos de fusão. Isso foi posteriormente confirmado por Wakai *et al.* (2014) que encontraram que oócitos de camundongos expressam *Mfn1*, *Mfn2* e *Opa1*, porém a superexpressão dessas GTPases não resulta em alongação mitocondrial. Udagawa *et al.* (2014) também observaram que o nocaute da DRP1 no oócito resulta em grave efeito sobre a fertilidade. Este efeito foi ocasionado por um defeito no mecanismo de secreção de fatores parácrinos derivados do oócito, resultando em incapacidade do oócito em dirigir a foliculogênese. Todavia, apesar de tais oócitos apresentarem forte agregação mitocondrial, os efeitos sobre a fertilidade verificados neste modelo não podem ser atribuídos exclusivamente às mitocôndrias, uma vez que a DRP1 é também envolvida em vários outros processos celulares (e.g., brotamento de vesículas secretórias; UDAGAWA *et al.*, 2014).

Além disso, a superexpressão de *Mfn2* em oócitos murinos resultou em diminuição da taxa de GVBD (quebra da vesícula germinativa; XI-RUI, 2015) durante a maturação *in vitro*. Já o *knockdown* de *Mfn2* por siRNA em oócitos crescidos resultou em alterações na morfologia da rede mitocondrial e no número de mitocôndrias oocitárias, assim como, em defeitos no fuso, no alinhamento dos cromossomos, taxa de GVBD e na taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB1; ZHANG *et al.*, 2016). Porém, nada se sabe sobre a influência do MFN2 no crescimento oocitário e na herança mitocondrial.

Visando compreender o papel das mitofusinas nos oócitos, nosso grupo nocauteou o *Mfn1* (*Mfn1*-null), o *Mfn2* (*Mfn2*-null) ou ambos (*Mfn*-dm) em oócitos de camundongos (dados não publicados). Os oócitos *Mfn2*-null apresentaram menor diâmetro (*Mfn2*-null = $78,6 \pm 0,68$ vs. WT = $85,7 \pm 0,49$ μm) e menor taxa de ovulação (*Mfn2*-null = $10,3 \pm 4,29$ vs. WT = $23,0 \pm 3,82$ oócitos/fêmea). Todavia, oócitos imaturos *Mfn2*-null não foram afetados quanto ao nível de mtDNA

e ATP. O número de nascimentos de filhotes oriundos de oócitos *Mfn2*-null e WT também diferiu (dados não publicados), revelando uma possível subfertilidade devido a deleção do *Mfn2* no gameta. Ademais, a progênie oriunda de oócitos *Mfn2*-null apresentou maiores níveis de glicose pré (Mfn2-null 135±3,9 vs. WT =115±3,5 mg/dl) e pós-jejum (Mfn2-null = 172±7,2 vs. WT =137±4,1 mg/dl).

Baseado nos achados apresentados acima, propomos neste trabalho investigar mais a fundo o papel exercido pelo MFN2 no oócito. Embora nosso grupo não tenha sido observado até o momento efeito do nocaute deste gene sobre a função mitocondrial (baseado apenas na distribuição mitocondrial e do RE, e na mensuração dos níveis de mtDNA e ATP no oócito), é possível que tal efeito tenha se dado de forma menos aparente (dados não publicados). Como evidência disso, pode-se citar os elevados índices glicêmicos presentes na progênie já com nove semanas de idade. Devido ao papel do MFN2 na regulação do metabolismo energético (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; ZORZANO *et al.*, 2015), este fenótipo pode ser oriundo de uma possível disfunção mitocondrial ou do RE. Ainda, o efeito do MFN2 pode estar associado com o seu papel no recrutamento de PARKIN para a mitocôndria (CHEN e DORN, 2013), bem como, na sua função na formação dos autofagossomos (HAILEY *et al.*, 2010) e na fusão destes com lisossomos (ZHAO *et al.*, 2012).

HIPÓTESE

HIPÓTESE

- O nocaute condicional do *Mfn2* (*Mfn2*-null) no oócito resulta em um maior distanciamento entre a mitocôndria e o RE. Assim como em outros tecidos, isso leva não apenas ao stress do ER, mas também ao acúmulo de gotas lipídicas, diminuição da beta-oxidação e da via mitofágica. Essas alterações oocitárias resultam na herança de mitocôndrias disfuncionais para a progênie, ocasionando síndrome metabólica caracterizada pelo aumento de peso, menor tolerância á glicose e resistência á insulina.

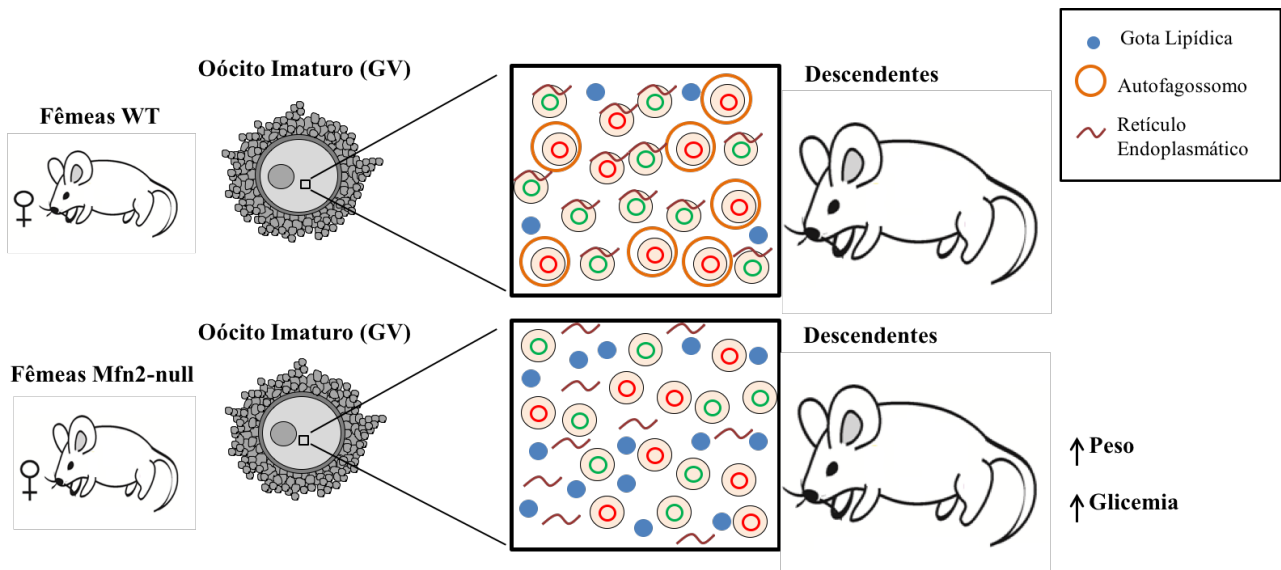


Figura 6. Modelo hipotético. Em comparação com fêmeas selvagens (WT), o nocaute condicional do *Mfn2* (*Mfn2*-null) no oócito resulta em maior distância entre mitocôndria e retículo endoplasmático, acúmulo de gotas lipídicas e diminuição na formação de autofagossomos. Isso leva a herança de mitocôndrias disfuncionais que resulta em síndrome metabólica na progênie oriunda de oócitos *Mfn2*-null.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Analisar a função da mitocôndria e do RE, bem como a ocorrência de mitofagia em oócitos Mfn2-null e WT.

Objetivos específicos

- Confirmar a presença de alterações metabólicas na progênie oriunda de oócitos WT e Mfn2-null analisando a capacidade desses animais de metabolizar glicose, a presença de resistência a insulina e o ganho de peso.

- Analisar oócitos imaturos Mfn2-null e WT por PCR quantitativo (qPCR) quanto a expressão de genes associados com: 1) a dinâmica mitocondrial; 2) a função mitocondrial; 3) o stress do RE; 4) a competência oocitária; e, 5) a via mitofágica.

- Analisar a capacidade dos oócitos imaturos Mfn2-null e WT realizarem a maturação *in vitro* (MIV).

- Analisar oócitos imaturos Mfn2-null e WT por microscopia de fluorescência quanto ao $\Delta\Psi_m$, NAD(P)H e FAD.

- Analisar oócitos imaturos Mfn2-null e WT, por imunofluorescência, quanto a co-localização de mitocôndrias com autofagossomos (Lc3b).

- Analisar oócitos imaturos Mfn2-null e WT por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) quanto à morfologia, o tamanho e o contato entre mitocôndrias e RE. Além disso, quantificar o número de autofagossomos e lisossomos.

- Analisar oócitos maduros Mfn2-null e WT por microscopia confocal quanto à presença e a quantidade de gotas lipídicas. Também analisar a expressão de genes relacionados com a síntese e metabolismo lipídico nas células do cumulus de COCs com oócitos Mfn2-null e WT.

PLANO DE TRABALHO

PLANO DE TRABALHO

O presente projeto foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LAGENBIO), localizado no Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Esse projeto se enquadrou como um desmembramento de um projeto maior do nosso grupo intitulado “Bases moleculares da herança mitocondrial: o papel da fusão mitocondrial” (Jovem Pesquisador - FAPESP 2012/50231-6). O principal objetivo do presente projeto foi investigar em oócitos os efeitos do nocaute de *Mfn2*. Nossos estudos foram direcionados no sentido de investigar os efeitos deste nocaute sobre a função da mitocôndria, do RE e a ocorrência de mitofagia a fim de ajudar a elucidar alguns dos dados preliminares não publicados. Conforme apresentado anteriormente, tínhamos fortes evidências (ainda não publicadas) de que oócitos *Mfn2*-null apresentam disfunções associadas com esses processos/organelas que resultaram em um indicativo de síndrome metabólica na progênie. Neste sentido, objetivou-se esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes a estas disfunções.

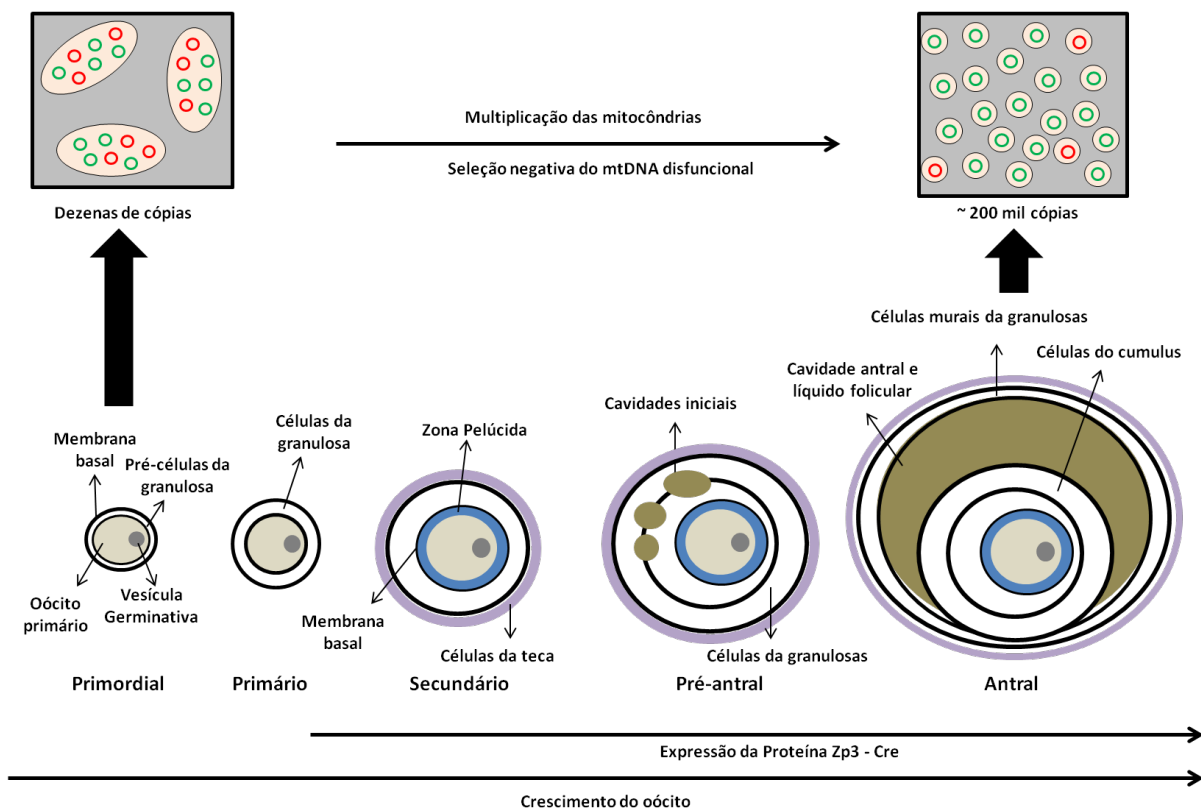


Figura 7. Crescimento dos folículos ovarianos. O mtDNA não é replicado na linhagem germinativa durante o início do desenvolvimento folicular, sendo assim, há poucas dezenas de cópias de mtDNA nas células germinativas primordiais (PGCs). No entanto, nas fases seguintes do desenvolvimento da linhagem germinativa da fêmea, o mtDNA é intensamente replicado, atingindo ~200.000 cópias no oócito maturo. Os oócitos nocaute *Mfn2* serão obtidos de fêmeas portadoras de 45-80% de mtDNA NZB, cujo o éxon 6 do gene *Mfn2* foi excisado condicionalmente nos oócitos em crescimento. Isso se deve a sequências loxP flanqueando a região alvo do *Mfn2*, que juntamente com a enzima cre-recombinase resulta na excisão da região flanqueada. A expressão de cre-recombinase será sob o comando do promotor *Zp3* (*Zp3-Cre*), o qual é exclusivamente expresso em oócitos a partir do estágio de folículo primário.

Para obtenção do modelo animal utilizado neste projeto, fêmeas tiveram o éxon 6 do gene *Mfn2* excisado condicionalmente nos oócitos em crescimento (figura 7). Isso foi possível uma vez que esta linhagem contém sequências loxP flanqueando a região alvo do *Mfn2* (CHEN *et al.*, 2007), o que na presença da enzima cre-recombinase resulta da excisão da região flanqueada. Para expressão de cre-recombinase, utilizamos animais que expressam a enzima sob o comando do promotor *Zp3* (*Zp3-Cre*; DE VRIES *et al.*, 2000), o qual é exclusivamente expresso em oócitos a partir do estágio de folículo primário (SUN *et al.*, 2008). Os acasalamentos necessários para a obtenção dos oócitos *Mfn2*-Null estão representados na figura 8.

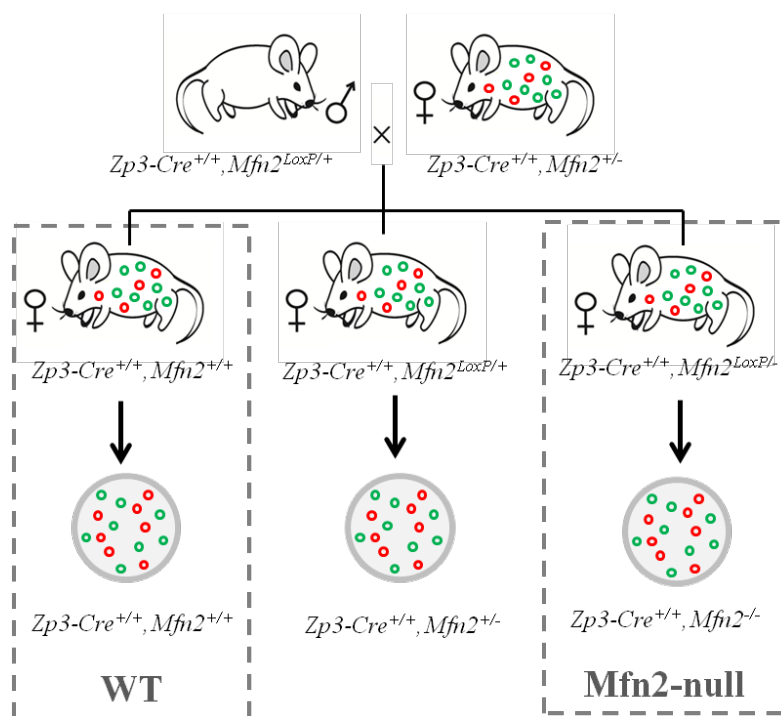


Figura 8. Acasalamentos necessário para obtenção de oócitos heteroplásmicos $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{-/-}$ (*Mfn2*-null) e $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{+/+}$ (WT). Camundongos machos $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{LoxP/+}$ foram acasalados com fêmeas heteroplásmicas e portadoras de genótipo $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{+/-}$. Fêmeas heteroplásmicas portadoras do genótipo $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{LoxP/-}$ foram utilizadas para obtenção de oócitos *Mfn2*-null. Já as fêmeas heteroplásmicas portadoras do genótipo $Zp3-Cre^{+/+}, Mfn2^{+/+}$ foram utilizadas para obtenção dos oócitos WT.

Foram coletados oócitos GV de fêmeas superovuladas com 5 semanas de idade para as análises de expressão gênica dos oócitos, $\Delta\Psi_m$, FAD e NAD(P)H, maturação *in vitro* e co-localização de mitocôndrias com autofagossomos. Já para as análises de contingente lipídico e expressão gênica das células do cumulus, os COCs foram coletados de fêmeas superovuladas com 3 semanas de idade. Quanto as análises realizadas na progênie oriunda dos oócitos *Mfn2*-null e WT, os testes de tolerância á glicose e resistência á insulina foram realizados em animais com 8 semanas de idade. O ganho de peso foi calculado a partir das diferenças de peso entre as semanas 4 e 5,5 e 6, e 6 e 7 de vida. Para as análises de por microscopia eletrônica de transmissão foi-se utilizado ovários de fêmeas com 5 semanas de idade.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Manutenção dos animais

Os camundongos foram mantidos seguindo os procedimentos já em uso na instituição, como previamente aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e pela Comissão de Ética (CEUA) da UFSCar. Os animais foram mantidos em um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, e temperatura de 25°C (NAGY *et al.*, 2003). Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e a ração (Presence Ratos e Camundongos, Purina).

Genotipagens

Para a genotipagem dos animais foi utilizado DNA total isolado de biópsia de orelha ao desmame, como descrito previamente (MACHADO *et al.*, 2015). Resumidamente, as amostras foram incubadas com 200 µl de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/ml proteinase K] por 3 horas à 55°C. Ao final, as amostras foram incubadas por 10 minutos à 95°C para inativação da proteinase K e armazenadas à -20°C até o uso. As amostras foram então diluídas em água ultrapura (Life Technologies) em uma proporção 1:5 para a genotipagem do *Mfn2* e 1:500 para o transgene Zp3-Cre. Para isso, foram utilizados primers 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: GTCAAACATTGTTGTCCTT).

A genotipagem do *Mfn2* foi realizada por PCR convencional como descrito por Chen *et al.* (2007) e o transgene Zp3-Cre foi analisado por PCR em tempo real (q-PCR) conforme descrito por de Vries *et al.* (2000). Resumidamente, para a genotipagem do *Mfn2* foram utilizados 400 ng de primer e o reagente para PCR JumpStart (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. No que diz respeito a ciclagem, para a fase de iniciação, as amostras passaram por um ciclo a 94°C durante 2 minutos, já para a desnaturação das fitas de DNA utilizou-se a temperatura de 94°C por 30 segundos, seguida do anelamento dos primers a 65°C durante 30 segundos. A fase de elongação foi realizada a 72°C durante 1 minuto e 3 segundos. As fases de desnaturação, anelamento e elongação ocorreram em uma repetição de 30 ciclos seguidos. Para a fase de elongação final, as amostras passam por um ciclo de 5 minutos a 72°C. Por fim, a PCR foi encerrada a 4°C. Em seguida, 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.

Já para a genotipagem do transgene Zp3-Cre foram utilizados 200 ng de primer e 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 foram segundo o proposto por Macabelli *et al.* (2014). Ao final de cada passo, a fluorescência do SYBR Green era mensurada a uma temperatura de 62°C. A amplificação de cada amostra foi realizada 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).

Coleta de oócitos imaturos (GV)

Para a coleta de oócitos de GV, fêmeas com 5 semanas de idade foram superovuladas através da administração de 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) via intraperitoneal (NAGY *et al.*, 2003). Após 42 a 44 horas, houve a eutanásia das fêmeas e seus ovários foram dissecados em solução fisiológica. Os ovários foram então transferidos para gotas de meio FHM (NAGY *et al.*, 2003) e os complexos cumulus-oócitos (COCs) obtidos por rompimento dos folículos antrais com o auxílio de uma agulha 30G (NAGY *et al.*, 2003). Em seguida, os oócitos foram desnudados das células do cumulus por pipetagem com auxílio de um capilar de vidro de diâmetro interno próximo ao dos oócitos (NAGY *et al.*, 2003) e lavados em solução tampão fosfatada (PBS) + 0,01% de BSA (BSA; Sigma-Aldrich). Somente oócitos íntegros, sem células do cumulus e em estágio de vesícula germinativa (GV) foram selecionados para uso nos experimentos posteriores (NAGY *et al.*, 2003).

Maturação in vitro (MIV)

Para a MIV, oócitos GV foram coletados e desnudados como descrito acima, porém na presença de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,1 mM a fim de bloquear a maturação oocitária estimulada pelo rompimento do folículo. Os oócitos foram então lavados em meio FHM sem IBMX a fim de remover esse composto e permitir a maturação oocitária sincronizada dos oócitos. Em seguida, os oócitos desnudos foram cultivados a 37°C e 5% CO₂ na incubadora (Thermo Fisher Scientific), em meio de cultura contendo penicilina e streptomina (1:100; Thermo Fisher Scientific) e soro fetal bovino (1:10; Thermo Fisher Scientific) em α -MEM (Thermo Fisher Scientific) sem IBMX. Após 3 horas de cultivo foi analisada a taxa de GV (oócitos com GV*100/total de oócitos) e após 15 horas a taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar (oócitos com PB1*100/total de oócitos).

Coleta oócitos ovulados

Para a coleta de oócitos de ovulados, fêmeas com 3 semanas de idade foram superovuladas através da administração de 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) via intraperitoneal (NAGY *et al.*, 2003). Após 47 horas da aplicação de eCG, foi administrado 5 U.I. de hCG (gonadotrofina coriônica humana; Folligon, MSD Saúde Animal). As fêmeas foram então sacrificadas 12h após a aplicação do hCG e os seus ovários dissecados em solução fisiológica. Os ovários foram então transferidos para gotas de meio FHM e os complexos cumulus-oócitos (COCs) obtidos por rompimento da ampola com o auxílio de uma agulha 30G (NAGY *et al.*, 2003). Todos os COCs de uma mesma fêmea foram desnudados em uma mesma gota de 20 a 30 μ L de solução de hialuronidase 0,7% diluída em FHM, dependendo da quantidade de COCs obtidos (NAGY *et al.*, 2003). Os oócitos foram então colocados em outra gota contendo apenas FHM. Foram coletados então 10 μ L da gota de hialuronidase contendo apenas as células do cumulus para futura extração de mRNA das células do cumulus.

Apenas oócitos íntegros, não degenerados e com a presença do PB1 foram selecionados e lavados em solução de PBS + 0,01% de BSA. Esses oócitos foram então utilizados para a quantificação de gotas lipídicas ou para análises de expressão gênica conforme será descrito abaixo.

Análise do $\Delta\Psi_m$

Para a análise de $\Delta\Psi_m$, os oócitos imaturos foram coletados conforme já descrito e então corados com a sonda TMRE (Thermo Fisher Scientific). Para isso, os oócitos foram incubados em FHM + TMRE (0,1 μ M) por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Então, estes foram lavados em 3 gotas FHM a fim de remover o excesso do corante. Após isso, os oócitos foram então posicionados em uma gota de 2,5 μ l de FHM coberta por 3 mL de óleo mineral (Sigma-Aldrich) em placa com fundo de vidro (Corning). Os oócitos foram analisados em microscópio de epifluorescência (Nikon eclipse Ti-9) e/ ou confocal (SP5, Leica). A densitometria média de cada oócito foi mensurada através do programa NIS-Elements BR Analysis 4.30.01 – NIKON. Para o cálculo do valor médio da densitometria, foi considerado o controle positivo de cada análise como referencial, assim como, o valor do background foi subtraído do valor médio da densitometria antes da análise estatística.

Microscopia de fluorescência

Para as análises por imunofluorescência, os oócitos imaturos coletados conforme já descrito, foram lavados três vezes em PBS + 0,01% BSA, e fixados por 20 min em 4% de paraformaldeído diluído em PBS. A seguir, os oócitos foram lavados três vezes em PBS + 0,01% BSA e a zona pelúcida removida por incubação por 15 minutos em solução ácida (Tyrode's acid; Sigma-Aldrich). Então, os oócitos foram lavados em PBS+ 0,01% BSA. Os oócitos foram então permeabilizados por

incubação por 30 minutos em 0,1% triton (Sigma-Aldrich) diluído em PBS + 1% BSA e posteriormente bloqueados por incubação por 2 horas em PBS + 1% BSA + 0,1% triton + 0,1M glicina. Os oócitos foram então marcados para mitocôndria e autofagossomo com os anticorpos anti-COXIV (#11967 – Cell Signaling Technology) e anti-LC3b (L7534 - Sigma-Aldrich). Para isso, os oócitos foram incubados à 4°C overnight com os dois anticorpos primários (produzidos em espécies diferentes) diluídos (100 x) em PBS + 1% BSA + 0,1M glicina. Posteriormente, os oócitos foram lavados três vezes em PBS + 1% BSA + 0,1M glicina e incubados por 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos secundários diluídos (200x) também em PBS + 1% BSA + 0,1M glicina. Finalmente, os oócitos foram lavados em PBS + 1% BSA + 0,1M glicina e posicionados em 5 µl de prolong (Life Technologies) sob uma lamina (Perfecta). Imediatamente após, colocou-se uma lamínula por cima e os oócitos foram então analisados em microscópio confocal (SP5, Leica) em uma magnitude de 63X em óleo. A co-localização das marcações foi analisada no software imageJ, com os plugins “VolumeJ” e “JACoP”, seguindo o descrito por De Brito e Scorrano (2008).

Análise de gotas lipídicas

Para a análise de gotas lipídicas foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima para as análises de imunofluorescência, porém a marcação foi realizada com a sonda Bodipy 493/503 (Thermo Fisher Scientific). Resumidamente, os oócitos ovulados foram coletados, fixados e permeabilizados como já descrito. Após, estes foram incubados com a sonda Bodipy 493/503 a concentração de 1mg/mL por 1 hora. Ao final, os oócitos foram lavados em 3 gotas de PBS+ 0,01% BSA para a remoção do excesso de corante e posicionados em 5 µl de prolong (Life Technologies) sob uma lamina (Perfecta). Imediatamente após, colocou-se uma lamínula por cima e os oócitos foram então analisados em microscópio confocal (SP5, Leica) em uma magnitude de 63X em óleo excitados com o laser Argônio 488. Para a captura da imagem, foi-se considerado o plano focal de maior diâmetro. A quantidade de gotas lipídicas presente no ooplasma foi mensurada utilizando o plugin “nucleus counter” do software ImageJ. Também foi mensurada a área do oócito para o cálculo da razão área das gotas lipídicas/área do oócito que foi comparada entre os grupos.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Ovários de animais de 5 semanas foram coletados, lavados e dissecados em solução fisiológica. Após, os ovários foram fixados por 4 horas à temperatura ambiente em solução de 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído (UDAGAWA *et al.*, 2014). Os ovários foram então pós-fixados por 1 hora em 2% de tetraóxido de ósmio à 4°C e desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol. Os ovários foram então emblocados em resina epóxi, cortados em secções ultra-

finas e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Para a análise foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão com aumento de 5 a 40 kV (UDAGAWA *et al.*, 2014; WAKAI, T. *et al.*, 2014).

As imagens foram então analisadas no software ImageJ. Utilizou-se o plugin Cell Counter para a contagem de lisossomos, autofagossomos, mitocôndrias totais e para os diferentes tipos de mitocôndrias encontradas. Além disso, as ferramentas de desenho livre foram usadas para a mensuração da distância entre mitocôndria e ER, comprimento do contato entre as organelas, área das mitocôndrias e área do ooplasma, seguindo o proposto por De Brito e Scorrano (2008).

Análise da expressão gênica por qPCR

Grupos de 30 oócitos imaturos foram coletados conforme já descrito. O pool de oócitos foram então colocados dentro de um tubo de 0,2 mL juntamente com o menor volume possível de PBS + 0,01% BSA. Os oócitos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C até o uso. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), como descrito previamente (MACABELLI *et al.*, 2014) e seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado nos oócitos 100 µL de mix contendo Trizol, água DEPC (Life Technologies) e GlycoBlue™ (Life Technologies) na proporção 20:3:0,3 respectivamente e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, 20 µL de clorofórmio (Millipore) foram adicionados e então as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Então foram retirados 50 µL da parte aquosa (superior) e colocados em um novo tubo. Em seguida foram adicionados 50 µL de álcool isopropílico (Millipore) e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram então colocadas a -20°C por 20 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet contendo ácidos nucleicos foi então lavado com 100 µL de etanol 75% (Millipore) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O excesso de etanol 75% foi removido com a pipeta e o pellet deixado secar para a total remoção do etanol. O pellet foi então eluído em 5µL de água DEPC. A amostra então foi tratada com 5 µL de solução de DNase I (ThermoFisher Scientific) mais 1 U/µL de RNaseOUT (ThermoFisher Scientific) para a degradação de DNA contaminante, conforme recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi convertido em cDNA utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific), e armazenado a -80°C até o uso.

As quantidades relativas dos transcritos alvos foram analisadas por qPCR utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) e primers específicos para os genes alvo ou referência em uma concentração final de 200 ng. Experimentos pilotos foram realizados para

determinação das condições adequadas de qPCR e análise da eficiência de amplificação dos ensaios. Os parâmetros da ciclagem foram segundo o proposto por Macabelli *et al.* (2014).

Foi analisado por q-PCR os transcritos para os seguintes genes alvos e endógenos. As sequencias dos primers encontram-se na tabela xx. Além disso, todos os primers utilizados foram desenhados com a ferramenta online Primer- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Foi priorizado, sempre que possível, o anelamento dos primers sobre junções exon-exon, a fim de se evitar amplificação de DNA genômico contaminante.

Gene	Forward	Reverse
Genes Alvo		
<i>Mfn1</i>	CTGCTTCCTGAGTGTCGAGG	ATGCACAAGACAGCCAGCTT
<i>Opa1</i>	ATTGTCCGAGCAGGAATCGG	AGGATTGGCAGACTTCACAGG
<i>Drp1</i>	TAGATCCAGATGGGCGCAGA	GCATCAGTACCCGCATCCAT
<i>Mfn2</i>	CATGAGGCCTTCCTCCTCAC	CAACTGCTCGTCCTGATGGA
<i>mt-Co1</i>	TCGCAATTCTACCGGTGTC	CTCCGTGTAGGGTTGCAAGT
<i>Sdha</i>	TCGACAGGGGAATGGTTTGG	GGACTCCTTCCGAGCTTCTG
<i>Tfam</i>	GAGCGTGCTAAAAGCACTGG	GACAAGACTGATAGACGAGGGG
<i>Nrf1</i>	AGGCGGTGAAATGACCATC	GCGGCAGCTTCACTGTTGAG
<i>Bmp15</i>	AAGGGAGAACCGCACGATTG	TGTACATGCCAGGAACCTCTG
<i>Gdf9</i>	CAACCAGGTGACAGGACCG	CACCCGGTCCAGGTTAAACA)
<i>Fgf8</i>	GCTAATTGCCAAGAGCAACGG	AGCGCCGTGTAGTTGTTCTC
<i>Acaca</i>	ACTGAGAAGGCAATGAAAGGTACT	AGACACTTGGACACTGTTACACAC
<i>Fasn</i>	TTCTAGACTCAATACACAGGCTGC	GAACCAGCCCTCTCCATATCCT
<i>Srebp1</i>	AGAGAGCAGAGATGGCTCTAATTG	CAGGTTCCCATAGACAAAGAGAA
<i>Cp1a</i>	AACAAAACATAGTCTTACCGCAGC	TGGTCAGCTATATTCGTTACACA
<i>Cpt1b</i>	ATACTCAAGTTCAGAGACGAACGC	GGTATCTCTTTTCCTCAGCTGTCT
<i>Cpt1c</i>	AAATCCTTCACCCTCATCGTCTTC	CATAACCCAACTGGAAGCACTCT
<i>Cpt2</i>	TTGTGTAAGGATTTTGAGAACGGC	ATATCAAACCAGGGGCTGAGA
<i>Plin2</i>	CAGATGACCCCTTTTGCTGTATTG	AACTGAGCTGTGAGTGACCATAAT
<i>Lc3b</i>	AGAGCGATAACAAGGGGGAGA	TGCAAGCGCCGTCTGATTA
<i>Park2</i>	CCCTGGAACCAGAGCTGAATTT	AAGCTACCGACGTGTCCTTG
<i>Gabpa</i>	CCGGGGAACAGAACAGGAAA	CAGTCTCGAGCATCCTTGTC
<i>Atf4</i>	TGGCGTATTAGAGGCAGCAG	TGAAGAGCGCCATGGCTTAG
<i>Atf6</i>	AAGCCTAAAGAGGACCTGTGG	TCTACTTGGTCCATCGTGGG
<i>Hsp90b1</i>	GACCTTCGGGTTTCGTCAGAG	AGCCTTCTCGGCTTTTACCC
<i>Hspa5</i>	CTATTCCTGCGTCCGGTGTGT	GCCCTGATCGTTGGCTATGA
Endógenos		
<i>Ppia</i>	GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC	GCGTGTAAGTCACCACCCT
<i>H2afz</i>	GGCCGTATTCATCGACACCT	ACTCAAGTACCTCTGCGGTG
<i>Hprt</i>	GTTGGGCTTACCTCACTGCT	TCATCGCTAATCACGACGCT

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para os genes alvo e endógeno. Os primers utilizados foram desenhados com a ferramenta online Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Foi priorizado, sempre que possível, o anelamento dos primers sobre junções exon-exon, a fim de se evitar amplificação de DNA genômico contaminante.

Os dados obtidos foram analisados seguindo o que foi proposto por Macabelli *et al.* (2014). Resumidamente, o software 7500 Software (v. 2.0.6; Life Technologies) calculou o valor CT sob um *threshold* de 0,2. O valor do CT foi então linearizado utilizando a fórmula 2^{-ct} . Os valores linearizados dos CTs dos genes alvos foram então divididos pela média geométrica dos CTs linearizados dos genes de referência. Esse valor normalizado foi então comparado entre os grupos.

Teste de tolerância á glicose e resistência á insulina (GTT e ITT)

O GTT e ITT foram realizados conforme descrito por Sebastián *et al.* (2012). Resumidamente, os animais foram colocados em jejum matinal de 6 horas. Após, foi medido o nível de glicose sanguínea no tempo 0. Para isso, foi feito um corte na cauda para a obtenção de sangue. Imediatamente após, foi realizada uma injeção intraperitoneal de 2mg/g de glicose (Sigma-Aldrich) ou 0,75 U/kg de insulina (Humulin®) diluídos em solução fisiológica, de acordo com o teste a ser realizado. Os níveis de glicose sanguínea também foram mensurados no tempo 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose e no tempo 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de insulina. Os níveis de glicose sanguínea foram mensurados com o aparelho FreeStyle Optium Neo (Abbott Diabetes Care) e tiras-teste para glicose no sangue (Abbott Diabetes Care).

Ganho de peso

Para a análise de ganho de peso, os filhotes oriundos de fêmeas portadoras de oócitos *Mfn2*-null, WT e heterozigoto nocaute para o *Mfn2* (*Mfn2*-het) foram alocados com no máximo 5 animais por caixa. Os animais foram pesados na quarta, quinta, sexta e sétima semana de vida. Para isso utilizou-se uma balança padrão. Foram analisadas pelo menos 3 gerações de filhotes de uma mesma fêmea e cada grupo teve pelo menos 3 fêmeas. Para o cálculo do ganho de peso, fez-se a subtração entre o peso de duas semanas consecutivas.

Análise de dados

Os experimentos acima foram repetidos com pelos 3 replicatas biológicas. Nas análises de qPCR, ao menos 5 replicatas biológicas foram consideradas por gene e por grupo. Nos experimentos de microscopia eletrônica, ao menos três ovários de animais distintos foram considerados por grupo. Já nos experimentos de microscopia de fluorescência ao menos 10 oócitos de 3 fêmeas distintas foram considerados por marcação e por grupo de pelo menos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS University Edition (SAS Institute Inc.). Nos casos em que os dados

seguiam as premissas de um teste paramétrico (homogeneidade de variâncias e distribuição normal), os grupos experimentais foram comparados por *t*-Student considerando nível máximo de significância igual a 5% (erro alfa). Do contrário, os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon assumindo-se também erro alfa igual a 5%. Os dados de ganho de peso e glicemia foram analisados por PROC MIXED, considerando como fatores principais tempo e grupo experimental. Os diferentes tempos de coleta de sangue foram considerados como medidas repetidas no tempo. Nesta análise foi determinado o efeito dos fatores principais e da interação entre eles por ANOVA seguido por teste *posthoc* de Tukey. Os resultados finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

RESULTADO E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do modelo

Confirmamos o *knockout* condicional do *Mfn2* utilizando qPCR para análise da quantidade de transcritos *Mfn2* em oócitos (GV) dos grupos WT e *Mfn2*-null. Os oócitos *Mfn2*-null apresentaram uma diminuição média de mais de duas mil vezes na quantidade de transcritos para o *Mfn2* ($0,0001 \pm 0,0001$) quando comparado com os oócitos do grupo WT ($0,2145 \pm 0,0378$). Também foi analisada a expressão de outros genes envolvidos com a dinâmica mitocondrial (*Mfn1*, *Opa1* e *Drp1*), contudo não foi observada diferença dos níveis de expressão destes entre oócitos WT e *Mfn2*-null (Figura 9). Portanto, estes dados comprovam a especificidade e a eficiência do sistema utilizado para realizar o *knockout* condicional do *Mfn2*.

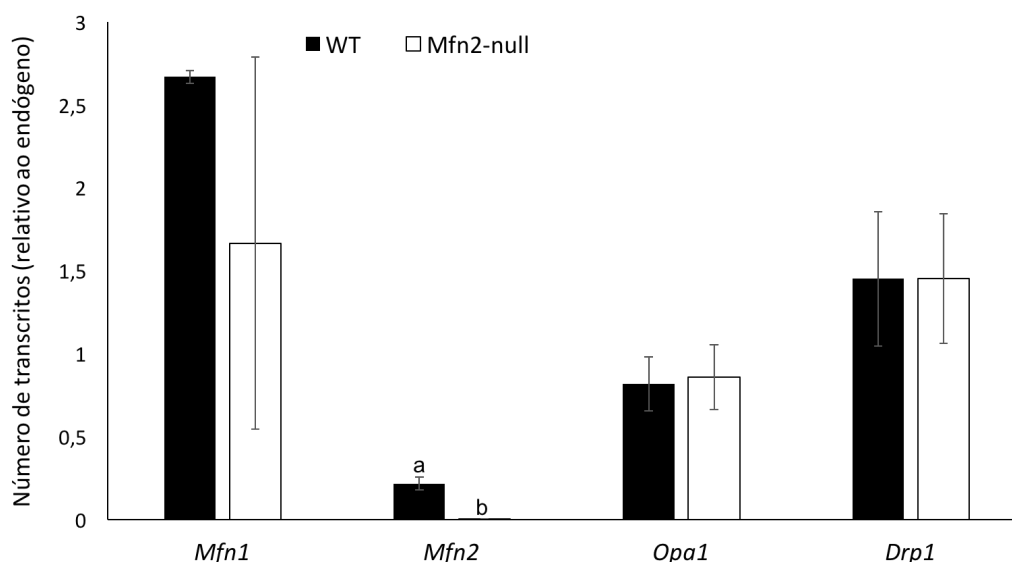


Figura 9. Quantificação de transcritos relacionados à dinâmica mitocondrial. Oócitos GV *Mfn2*-null e WT foram avaliados quanto a quantidade de transcritos *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1* e *Drp1*. Oócitos GV *Mfn2*-null só diferiram dos WT quanto aos níveis do transcrito *Mfn2*, confirmando o nocaute condicional no grupo *Mfn2*-null. Utilizaram-se 10 pools de oócitos oriundos de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Letras diferentes representam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos experimentais. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

O *knockout* condicional do *Mfn2* não resulta em alterações na competência oocitária

A fim de elucidar o efeito do *knockout* do *Mfn2* sob a competência oocitária, analisamos a quantidade de transcritos de *Bmp15* (*bone morphogenetic protein 15*), *Gdf9* (*growth differentiation factor 9*) e *Fgf8* (*family of growth factors 8*) em oócitos GV WT e *Mfn2*-null. Esses transcritos codificam para fatores parácrinos expressos pelo oócito, os quais desempenham de forma sinérgica papel-chave no desenvolvimento do COC (YAN *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 1996). Todavia, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 10). Isso sugere que o *knockout*

do *Mfn2* não afetou a comunicação oócito-granulosa, corroborando nossos achados prévios de que o *knockout* do *Mfn2* não afetou o crescimento oocitário nem a bioenergética mitocondrial (dados não publicados).

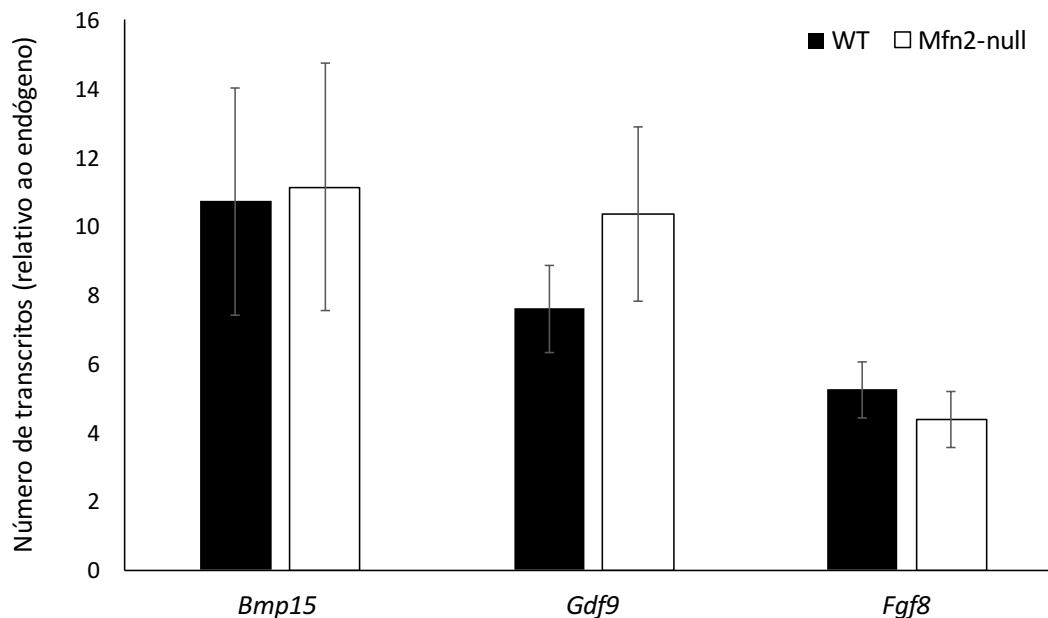


Figura 10. *Quantificação de transcritos relacionados à competência oocitária.* Oócitos GV Mfn2-null e WT foram avaliados quanto a quantidade de transcritos *Bmp15*, *Gdf9* e *Fgf8*. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Utilizaram-se 10 pools de oócitos oriundos de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Sendo assim, decidimos investigar o efeito do *knockout* do *Mfn2* sob a maturação oocitária e para isso analisamos a taxa de GV e de extrusão do PB1 durante a MIV. Os oócitos Mfn2-null não apresentaram diferença estatística quanto a taxa de GV após 3 horas de MIV, sugerindo que o *knockout* não afetou a progressão meiótica no estágio de rompimento da vesícula germinativa (GVBD; Tabela 2). Assim como, a maturação oocitária indicada pela extrusão do PB1 após 15 horas de cultivo, também não foi alterada (Tabela 2). Esses resultados não corroboram achados prévios envolvendo a interferência por RNA sobre a expressão do *Mfn2* em oócitos murinos (ZHANG *et al.*, 2016). No entanto, isso pode refletir uma diferença entre as estratégias de *knockout* e *knockdown* uma vez que a interferência por RNA leva a uma redução mais abrupta dos níveis do transcrito alvo.

Grupo	Taxa de GV	Taxa de extrusão do PB1
WT	16,09 %	47,32 %
Mfn2-null	15,22 %	56,52 %

Tabela 2. *Taxa de vesícula germinativa (GV) e de extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB1) durante a MIV.* Oócitos GV Mfn2-null e WT foram cultivados por 15 horas em meio de maturação oocitário. Após 3 horas de cultivo, a taxa de GV foi avaliada, através da presença ou não da GV em cada oócito. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. Ao fim do cultivo de 15 horas, a taxa de extrusão do PB1 foi analisada, através da presença ou não do

PB1 em cada oócito. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Utilizou-se 205 oócitos WT e 46 oócitos Mfn2-null para a análise de GV. Já para a análise de PB1 utilizaram-se 112 oócitos WT e 46 oócitos Mfn2-null.

O *knockout* condicional do *Mfn2* resulta em síndrome metabólica na progênie

Previamente, observamos que a progênie derivada de oócitos Mfn2-null apresenta evidência de alteração no metabolismo da glicose (dados não publicados). Esse fenótipo pode ser uma consequência de alterações no metabolismo energético do oócito, como discutido acima. Afim de confirmar esse achado, primeiramente investigamos mais a fundo o metabolismo da glicose na progênie de fêmeas WT e Mfn2-null com machos WT. A progênie oriunda de oócitos Mfn2-null com machos WT, são heterozigotas nocaute para o *Mfn2* em todos os tecidos. Sendo assim, um segundo grupo controle, composto por animais heterozigotos nocaute para o *Mfn2* em todos os tecidos, porém oriundos de oócitos também heterozigotos nocaute para o *Mfn2* (Mfn2-het), foi considerado neste experimento. Com esse grupo, objetivou-se provar que os efeitos encontrados são devido ao efeito do oócito Mfn2-null o qual originou a progênie e não devido ao fato da progênie ser heterozigota para o *Mfn2* em todos os seus tecidos. Isso se mostrou necessário devido ao importante papel do MFN2 na homeostase da glicose em diversos tecidos e sua relação com a resistência á insulina (SEBASTIÁN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2013).

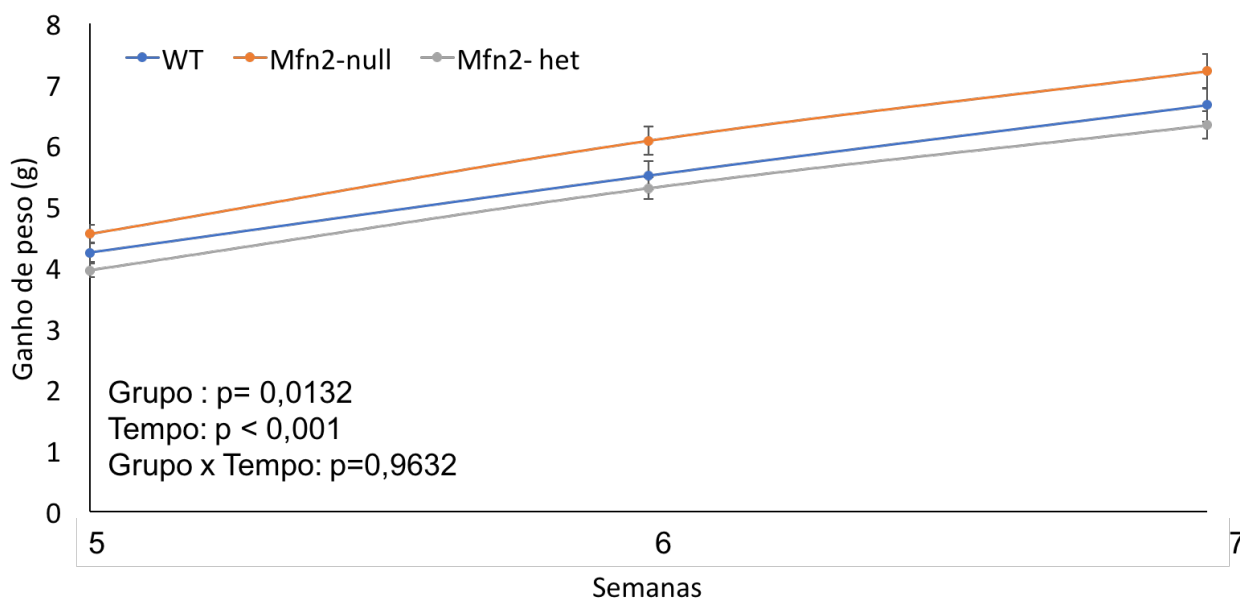


Figura 11. *Ganho de peso.* A progênie oriunda de oócitos Mfn2-null, WT e Mfn2-het foi avaliada quanto ao ganho de peso entre a quarta e quinta (5), quinta e sexta (6), e sexta e sétima (7) semana de vida. Foi observado efeito de grupo e de tempo, mas não da interação entre esses fatores. No tocante ao efeito de grupo, o grupo WT não diferiu do Mfn2-het ($P = 0.1403$) e nem do Mfn2-null ($P = 0.1519$), enquanto os grupos Mfn2-het e Mfn2-null diferiram entre si ($P = 0.0033$). Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Sendo assim, analisamos primeiramente o ganho de peso da prole entre três semanas de vida consecutivas (quarta e quinta, quinta e sexta, e sexta e sétima semana de vida) e realizamos em

seguida os testes de GTT (*Glucose Tolerance Test*) e ITT (*Insulin Tolerance Test*) nos descendentes de oócitos WT, Mfn2-null e Mfn2-het. A progênie oriunda de oócitos Mfn2-null apresentou ganho de peso elevado quando comparado ao grupo Mfn2-het, porém nenhum desses grupos diferiu do grupo WT (Figura 11). Além disso, a progênie de oócitos Mfn2-null apresentou maior nível de glicose sanguínea tanto em repouso quando após a administração de glicose ou insulina (Figura 12 e 13). Ademais, o grupo Mfn2-het se comportou de forma idêntica ao grupo WT, indicando que os efeitos encontrados nos animais Mfn2-null deveram-se ao *knockout* do *Mfn2* no oócito.

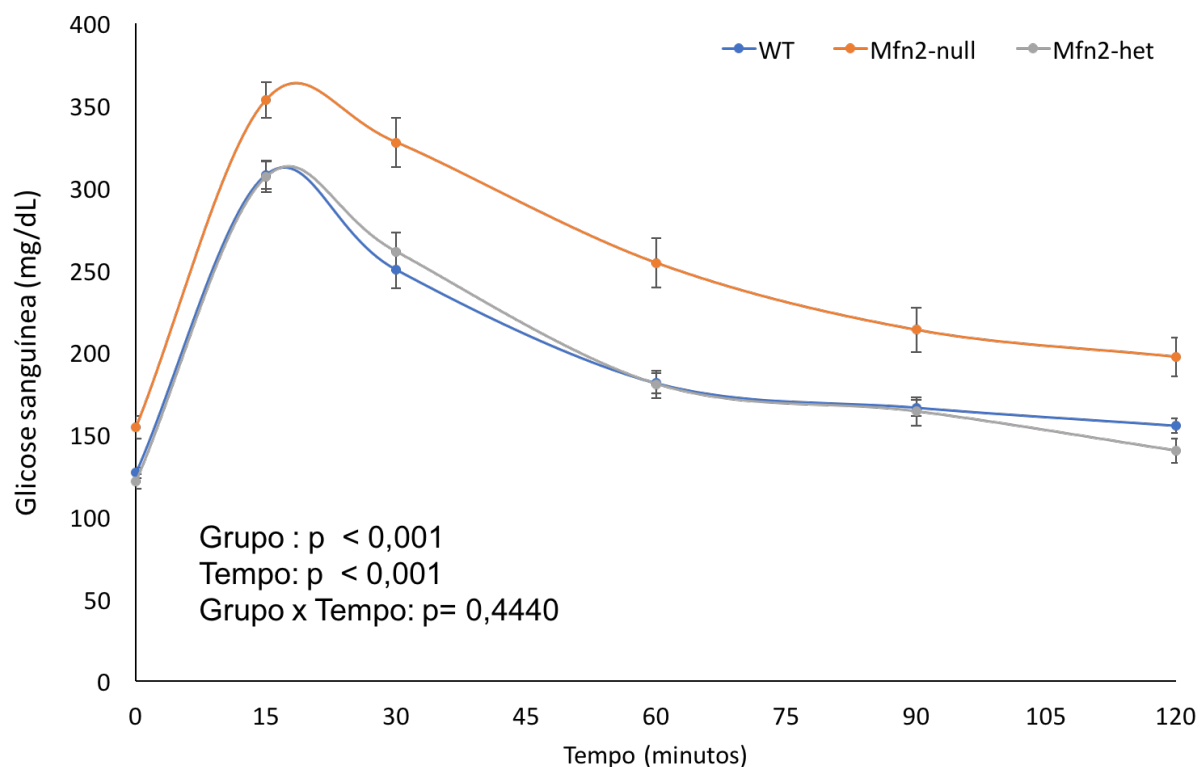


Figura 12. Teste de tolerância a glicose. A progênie de oócitos Mfn2-null, WT e Mfn2-het foram avaliadas quanto aos níveis de glicose sanguínea antes (tempo 0) e após (15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos) a administração de 2mg/g de glicose. Antes da realização desta análise, os animais foram mantidos em jejum de alimento por 6 horas. Foi observado efeito de grupo e de tempo, mas não da interação entre esses fatores. No tocante ao efeito de grupo, o grupo Mfn2-null diferiu do WT e Mfn2-het ($P = <0,0001$), enquanto os grupos WT e Mfn2-het não diferiram entre si ($P = 0,6137$). Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

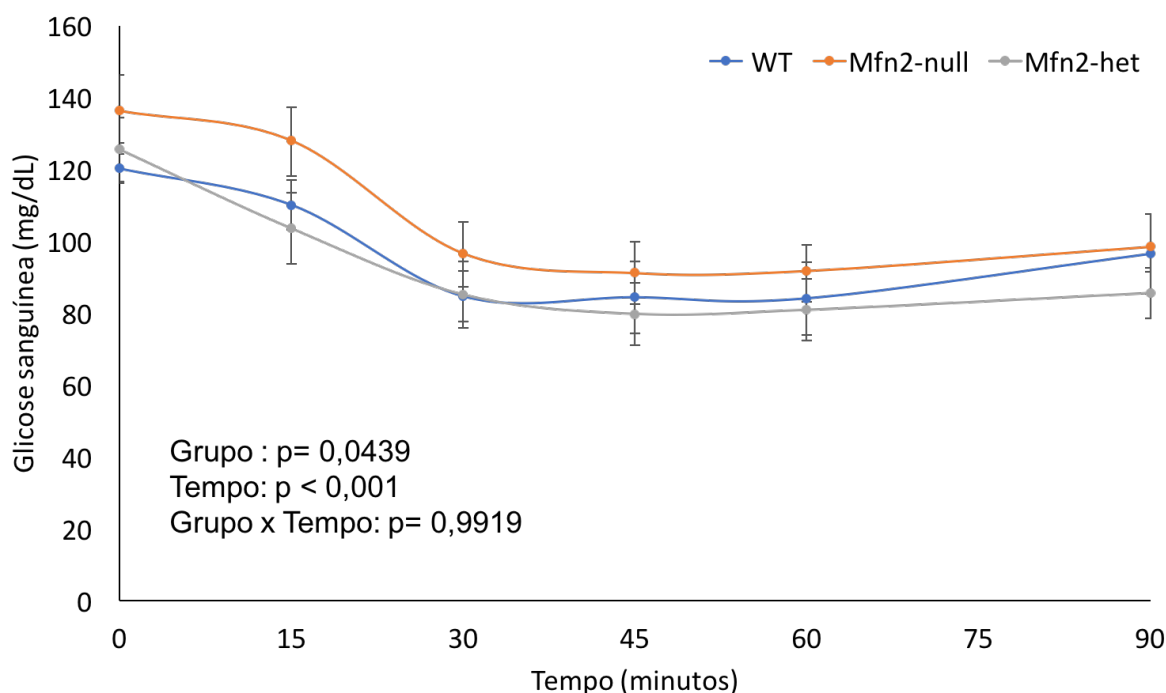


Figura 13. Teste de tolerância a insulina. A progênie de oócitos Mfn2-null, WT e Mfn2-het foram avaliadas quanto aos níveis de glicose sanguínea antes (tempo 0) e após (15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 45 minutos e 90 minutos) a administração de 0,75 UI/Kg de glicose. Antes da realização desta análise, os animais foram mantidos em jejum de alimento por 6 horas. Foi observado efeito de grupo e de tempo, mas não da interação entre esses fatores. No tocante ao efeito de grupo, o grupo Mfn2-null diferiu do WT ($P = 0,0173$) mas não do Mfn2-het (0,7762), enquanto os grupos WT e Mfn2-het diferiram entre si ($P = 0,0474$). Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

O *knockout* condicional do *Mfn2* resulta em alterações nas mitocôndrias oocitárias

Foi avaliado por qPCR a expressão no oócito de genes associados com a função mitocondrial. No entanto, oócitos GV do grupo Mfn2-null não diferiram do WT quanto a expressão dos genes *Sdha*, *mt-Co1*, *Tfam* e *Nrf1* (Figura 14). A SDHA (*Succinate dehydrogenase complex subunit A*) compõem o complexo II da cadeia respiratória, enquanto o MT-CO1 (*Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I*) compõem o complexo IV da cadeia respiratória. Sendo assim, ambos estão estritamente relacionados com o correto funcionamento da fosforilação oxidativa. Já foi demonstrado que o *knockout* ou *knockdown* de *Mfn2* pode afetar a expressão de *Sdha*, dependendo do tipo celular. Por exemplo, Sebastián *et al.* (2012) demonstraram que a quantidade de transcritos *Sdha* tende a aumentar em músculo sóleo *knockout* para *Mfn2*. Por outro lado, os níveis de *Sdha* encontram-se diminuídos em resposta ao *knockdown* do *Mfn2* em fibras musculares. Em oócitos, apesar da diferença numérica na expressão (WT = $3,42 \pm 1,73$ e Mfn2-null = $1,48 \pm 0,91$), não foi encontrado diferença estatística entre os grupos. Além disso, não encontramos diferença na quantidade de transcritos *downstream* a PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor g coactivator-1 a*): *Nrf1* (*Nuclear respiratory*

factor 1), que é responsável pela regulação da biogênese mitocondrial e da fosforilação oxidativa, e *Tfam* (*Transcription factor A*), que é responsável pela replicação, transcrição e reparo do mtDNA. Isso difere dos achados relatados para outros tipos celulares, onde a expressão do *Mfn2* se mostrou diretamente relacionada com a expressão de *Ppargc1a* (RYAN *et al.*, 2013; Figura 14).

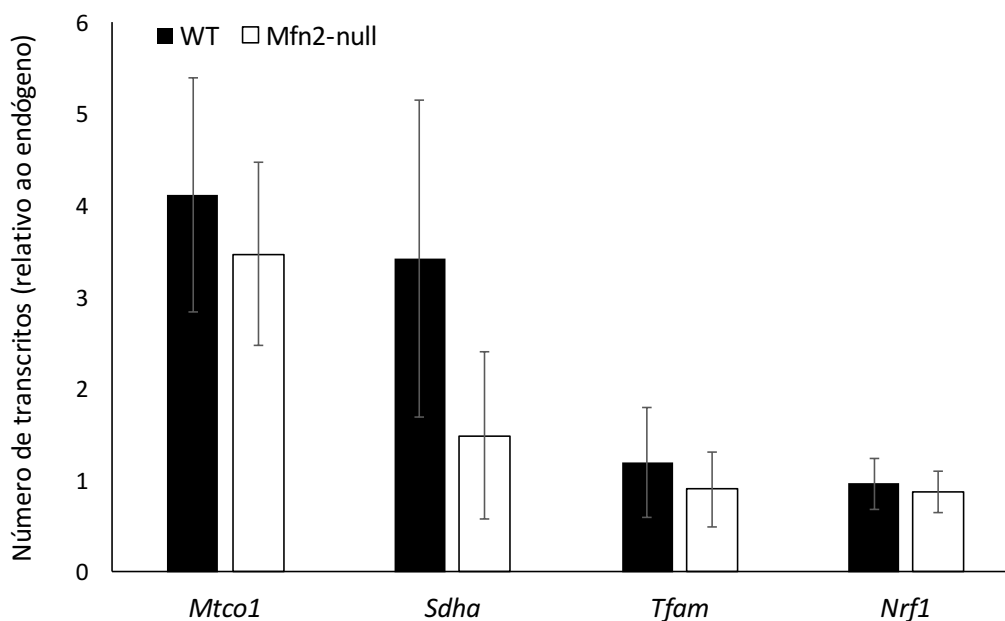


Figura 14. *Quantificação de transcritos relacionados à função mitocondrial.* Oócitos GV *Mfn2*-null e WT foram avaliados quanto a quantidade de transcritos *mt-Co1*, *Sdha*, *Tfam* e *Nrf1*. Oócitos GV *Mfn2*-null não diferiram dos WT quanto ao nível de nenhum dos transcritos avaliados ($P > 0,05$). Utilizaram-se 10 pools de oócitos oriundos de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

A relação entre morfologia e função de estruturas celulares é muito discutida na Biologia, e a mitocôndria parece ser um ótimo exemplo disso. A morfologia mitocondrial está estritamente relacionada com a capacidade da mitocôndria em converter energia, responder a sinais citosólicos, importar/exportar proteínas, lipídeos, solutos e metabólitos. Além disso, a arquitetura mitocondrial desempenha importante função na proteção do citosol contra a exposição a substratos mitocondriais, no contato entre mitocôndrias e na resistência da mitocôndria a possíveis alterações no número de complexos e proteínas da cadeia respiratória (PERNAS e SCORRANO, 2015). Com o intuito de se verificar o efeito do *knockout* do *Mfn2* sobre a morfologia e função mitocondrial, os oócitos de ambos os grupos WT e *Mfn2*-null foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão.

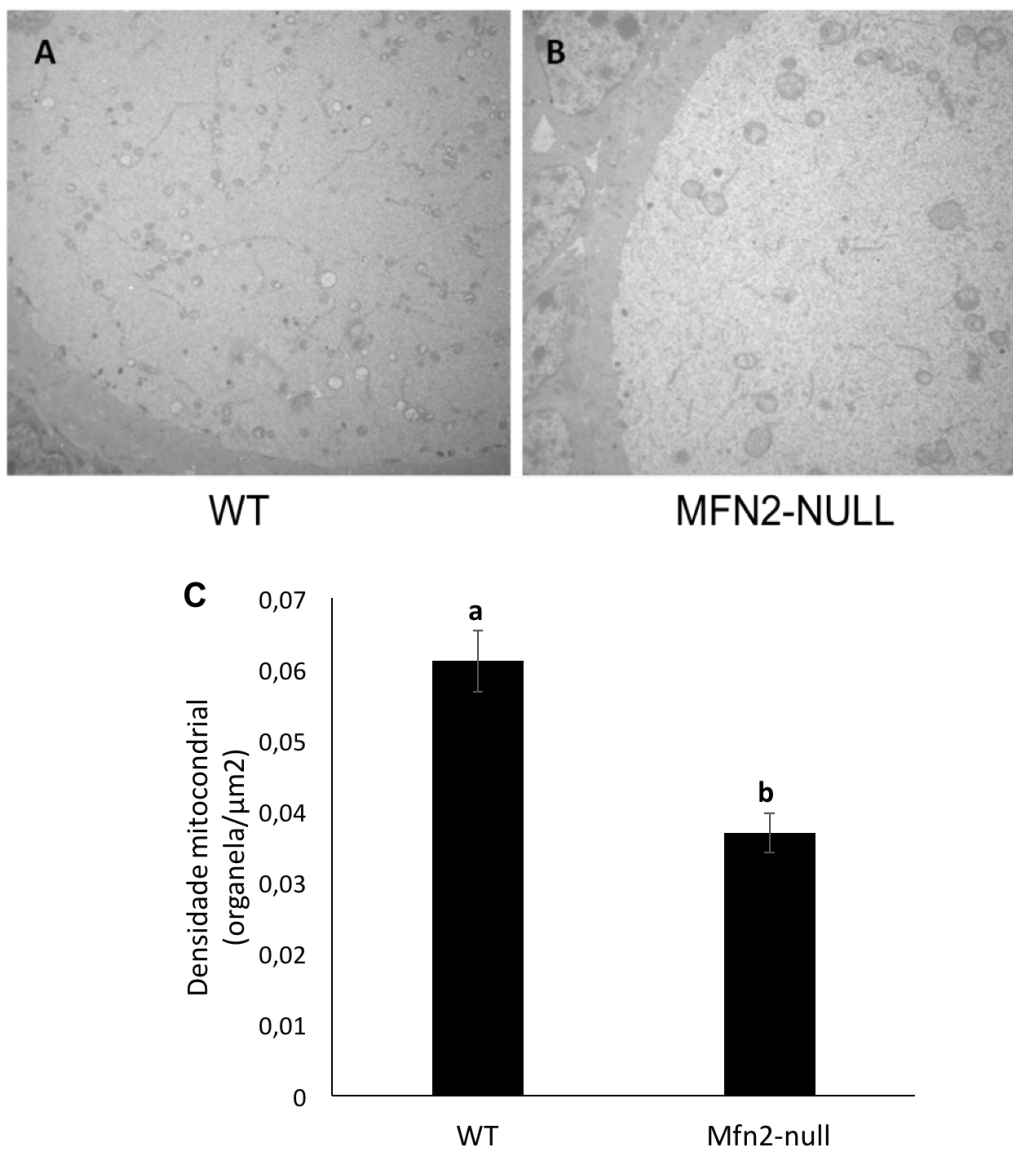


Figura 15. *Densidade mitocondrial.* Imagens com 20kx de aumento foram utilizadas para a quantificação das mitocôndrias. O número de mitocôndrias de cada imagem foi dividido pela área de ooplasma considerada. A) Oócito do grupo WT e B) Mfn2-null. C) Quantificação da densidade mitocondrial de oócitos WT e Mfn2-null. Nota-se que o grupo Mfn2-null apresentou menor densidade mitocondrial que o WT. Letras diferentes representam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos experimentais. Foram utilizadas 65 imagens de oócitos WT e 39 de Mfn2-null para essa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Em condições normais, oócitos apresentam mitocôndrias pequenas, redondas ou ovais, com matriz densa e cristas circulares que podem apresentar em alguns casos vacúolos bem definidos (WAKAI, T. *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2018). Todavia, oócitos GV do grupo Mfn2-null diferiram do WT quanto a densidade mitocondrial (WT = $0,061 \pm 0,004$ e Mfn2-null = $0,037 \pm 0,003$ organela/ μm^2 ; figura 15), área mitocondrial (WT = $0,589 \pm 0,015$ e Mfn2-null = $1,673 \pm 0,101 \mu\text{m}^2$; Figura 16) e morfologia das cristas (Figura 17). No tocante esta última análise, as variações de cristas observadas nas amostras experimentais foram classificadas em tipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os tipos 1 e 2 são comumente observados em oócitos selvagens, enquanto os tipos 3 e 4 podem ser considerados

anormais. Portanto, a maior incidência de mitocôndrias do tipo 3 nos oócitos Mfn2-null indica uma possível disfunção destas organelas. Esses achados corroboram observações prévias em cardiomiócitos (PAPANICOLAOU *et al.*, 2011) e células de Purkinje (CHEN *et al.*, 2007), sugerindo que o MFN2 está envolvido com a manutenção da morfologia mitocondrial também em oócitos. Além disso, esse fenótipo mitocondrial em oócitos tem sido relacionado com stress oxidativo (ZHANG *et al.*, 2013), degeneração folicular (GULYAS e MATTISON, 1979), idade materna avançada (SCHAFER *et al.*, 1996; RAMBAGS *et al.*, 2014), diabetes (WANG *et al.*, 2009) e obesidade materna (BOUDOURES *et al.*, 2014). As alterações mitocondriais nos oócitos causadas por obesidade da mãe podem resultar em resistência a insulina na F1, como também afetar a morfologia mitocondrial de oócitos por até três gerações (SABEN *et al.*, 2016). Isso demonstra que a herança de mitocôndrias anormais pode ser relacionada com a herança de resistência à insulina na prole, muito provavelmente associada a alterações epigenéticas (SABEN *et al.*, 2016). Sendo assim, esses achados corroboram os nossos dados prévios (não publicados) onde a prole oriunda de oócitos Mfn2-null apresentou maiores níveis de glicose pré (Mfn2-null $135 \pm 3,9$ vs. WT = $115 \pm 3,5$ mg/dl) e pós-jejum (Mfn2-null = $172 \pm 7,2$ vs. WT = $137 \pm 4,1$ mg/dl).

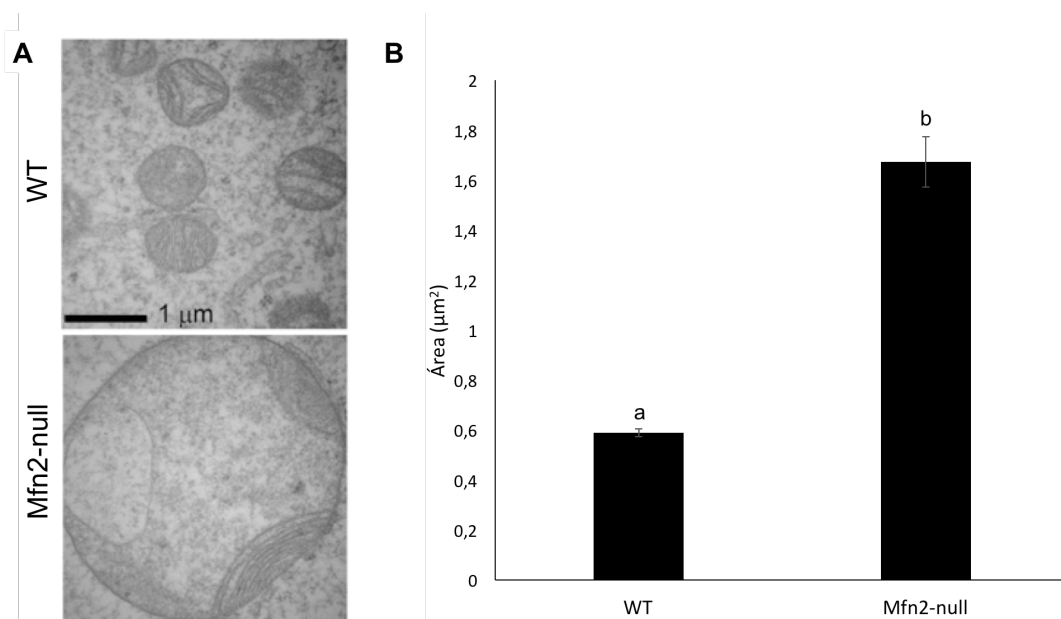


Figura 16. Área mitocondrial. Imagens com 20kx de aumento foram utilizadas para a quantificação da área mitocondrial. A) Mitocôndrias oocitárias do grupo WT e Mfn2-null. C) Quantificação da área mitocondrial de oócitos WT e Mfn2-null. Nota-se que o grupo Mfn2-null apresentou mitocôndrias com maior área que as do grupo WT. Letras diferentes representam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos experimentais. Nessa análise foram mensuradas 415 mitocôndrias de oócitos WT e 173 de oócitos Mfn2-null. Em cada grupo foram utilizadas imagens de 5 animais diferentes. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

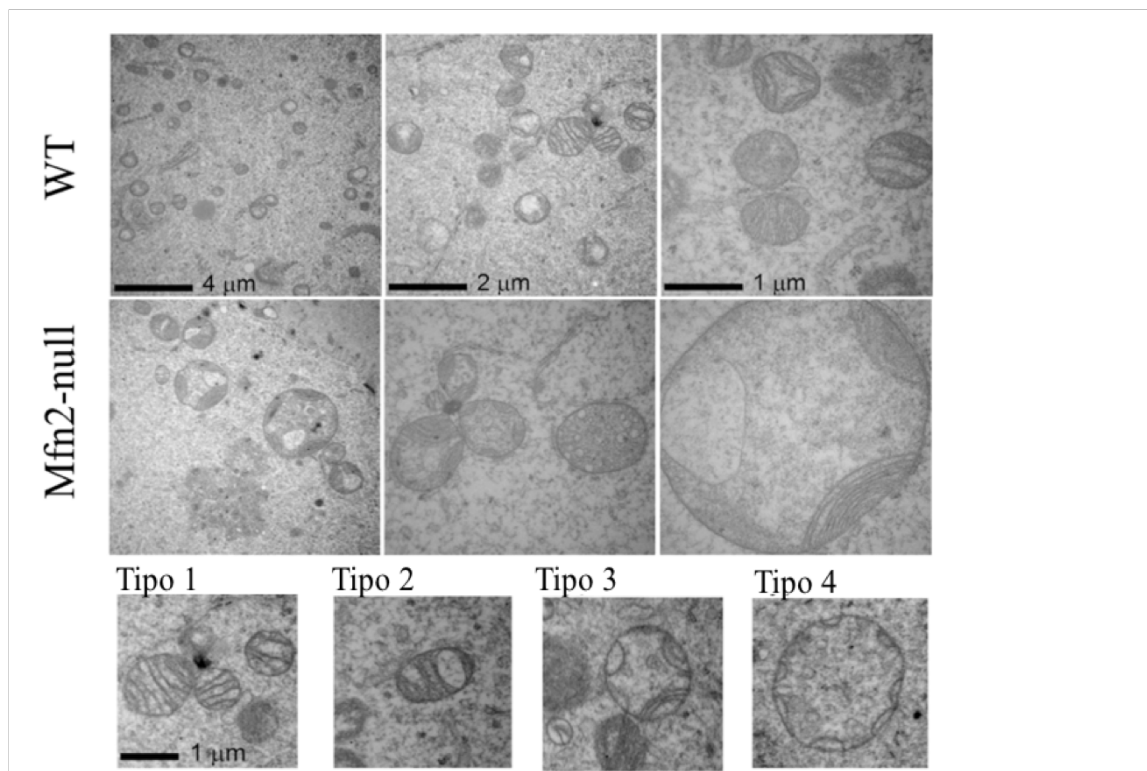
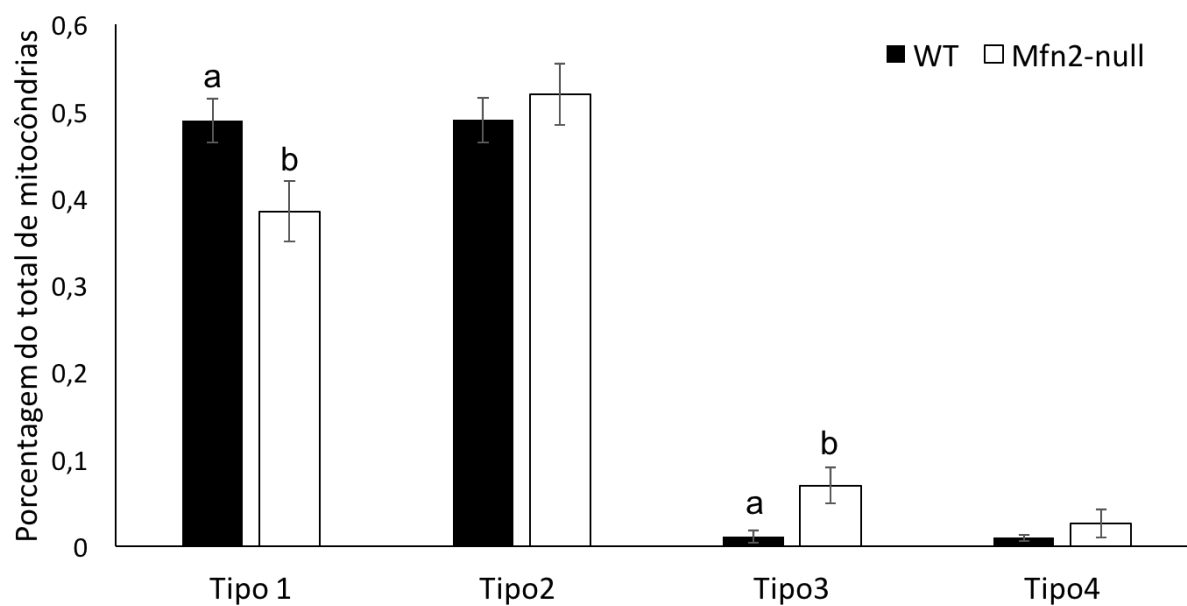
A**B**

Figura 17. Morfologia das cristas mitocondriais. Os tipos mitocondriais encontrados nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram classificados em 4 diferentes grupos de acordo com a morfologia das cristas mitocondriais. A) Tipo 1: Mitocôndria com estruturas de cristas normais. Tipo 2: Mitocôndria com vacúolos na estrutura das cristas. Tipo 3: Mitocôndria com menos cristas, formando estruturas arqueadas. Tipo 4: Mitocôndria com pouquíssimas cristas, formando pequenas estruturas arqueadas. B) Quantificação de cada tipo mitocondrial encontrado em relação ao total de mitocôndrias nos grupos WT e Mfn2-null (imagens com 20kx). Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais. Para essa análise foram utilizadas 65 imagens de oócitos WT e 53 Mfn2-null oriundas de 5 animais diferentes para cada grupo. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

A combinação de inchamento mitocondrial e anormalidades de cristas é geralmente associada com um comprometimento da bioenergética mitocondrial (BEREITER-HAHN e VÖTH, 1994). Sendo assim, analisamos o $\Delta\Psi_m$ (Figura 18) e quantificamos o contingente de FAD e NAD(P)H (Figura 19) em oócitos GV WT e Mfn2-null. Todavia, não encontramos diferença estatística entre os grupos analisados. Isso não corrobora a literatura uma vez que em diversos modelos e tecidos celulares é sabido que a repressão de *Mfn2* resulta na diminuição do consumo de oxigênio, da oxidação de glicose e ácidos graxos, assim como, na diminuição do $\Delta\Psi_m$ (BACH *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005; PICH *et al.*, 2005; SEBASTIÁN *et al.*, 2012). Isso sugere que as alterações observadas na arquitetura mitocondrial não necessariamente estão associadas a disfunção dessa organela nos oócitos em estágio de GV.

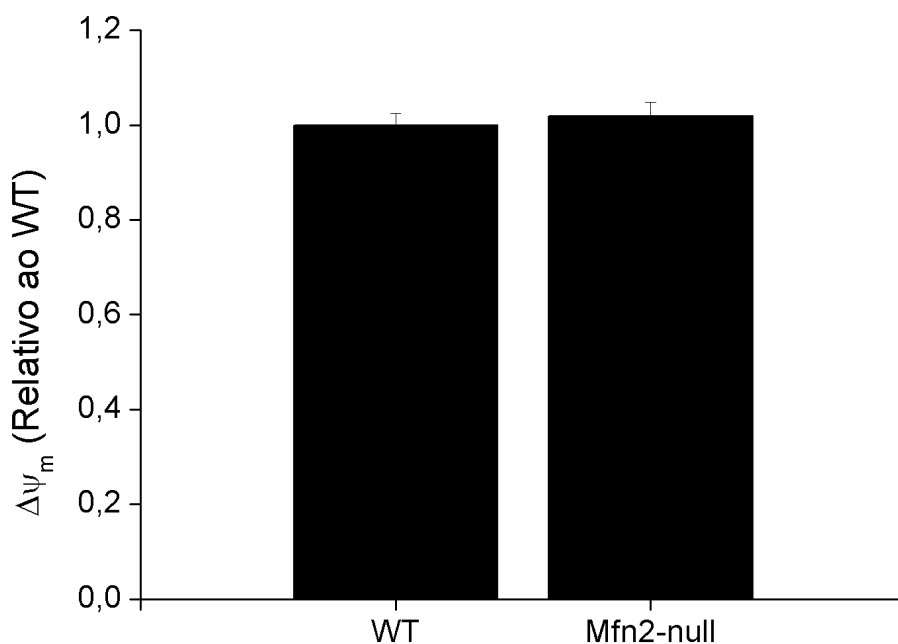


Figura 18. Potencial de membrana mitocondrial. Oócitos GV dos grupos WT e Mfn2-null foram incubados em FHM + TMRE para análise do potencial de membrana mitocondrial. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Foram utilizados 100 oócitos do grupo WT oriundos de 3 animais diferentes e 121 oócitos do grupo Mfn2-null oriundos de 3 animais diferentes. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Porém, devido a possibilidade de que as alterações mitocondriais observadas resultassem em disfunções mitocondriais em estágios mais tardios do desenvolvimento oocitário, analisamos o FAD e NAD(P)H também em oócitos ovulados. Diferentemente do visto em oócitos GV, oócitos ovulados apresentaram um aumento no contingente de FAD nos oócitos Mfn2-null (Figura 20).

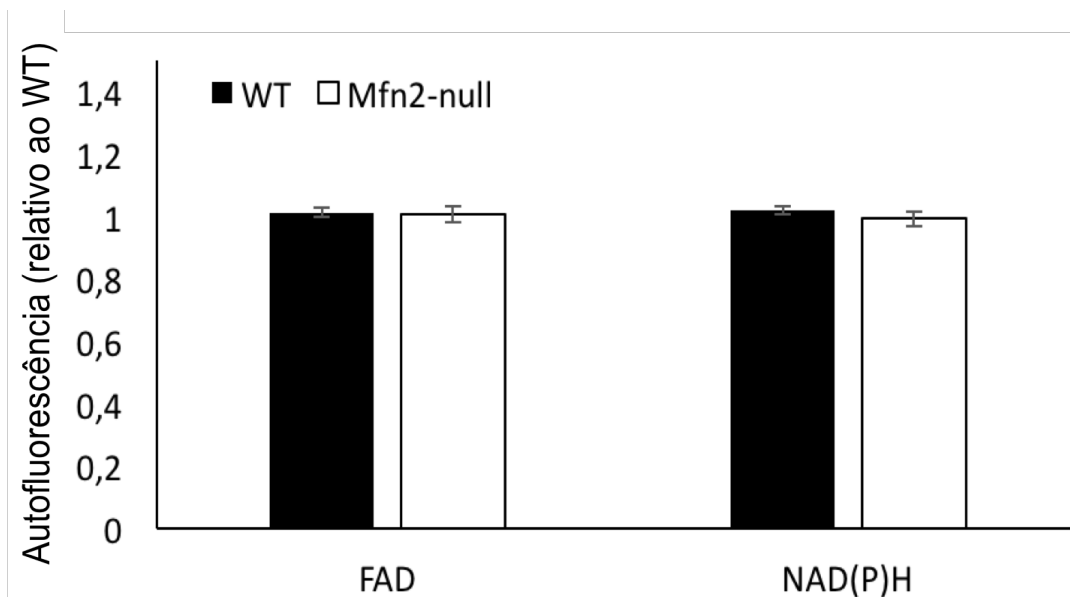


Figura 19. *Quantificação de NAD(P)H e FAD.* Oócitos GV dos grupos WT e Mfn2-null tiveram seu contingente de NAD(P)H e FAD quantificados por autofluorescência. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Foram utilizados 265 oócitos do grupo WT oriundos de 6 animais diferentes e 267 oócitos do grupo Mfn2-null oriundos de 6 animais diferentes. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

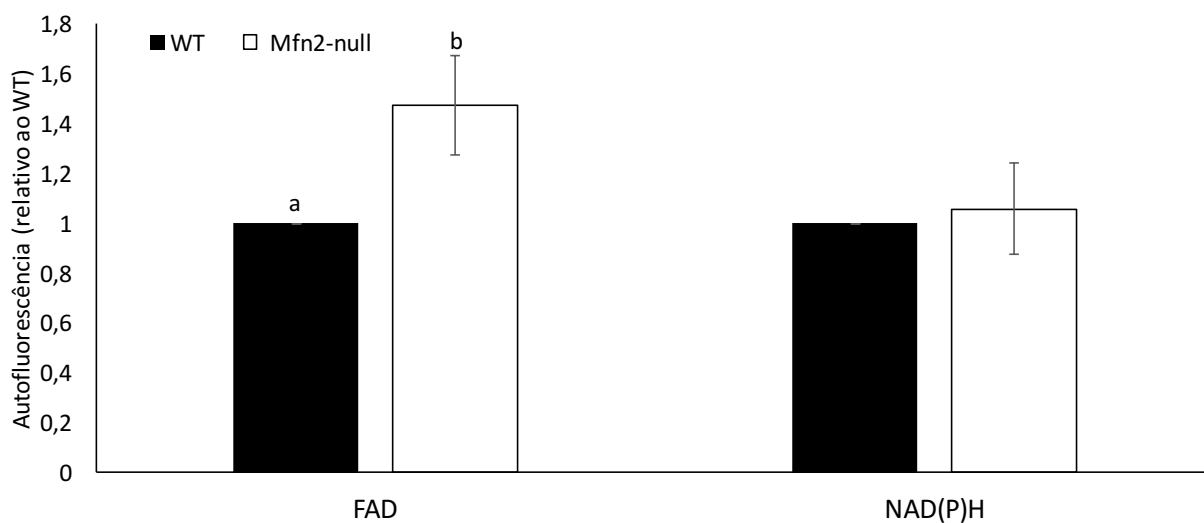


Figura 20. *Quantificação de NAD(P)H e FAD.* Oócitos ovulados dos grupos WT e Mfn2-null tiveram seu contingente de NAD(P)H e FAD quantificados por autofluorescência. Letras diferentes representam uma diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as amostras. Foram utilizados 171 oócitos do grupo WT oriundos de 5 animais diferentes e 87 oócitos do grupo Mfn2-null oriundos de 4 animais diferentes. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

O *knockout* condicional do *Mfn2* não resulta em stress do ER

Apesar da deficiência de MFN2 levar ao estresse do RE em diversos tecidos (NGOH *et al.*, 2012; SEBASTIÁN *et al.*, 2012), não encontramos diferença estatística na expressão de genes relacionados ao estresse do RE nos oócitos GV Mfn2-null (Figura 21). Porém, foi encontrado uma maior distância entre mitocôndria e RE nesses mesmos oócitos (Figura 22 A e B). Além disso,

encontramos um maior comprimento de contato entre mitocôndrias e RE no grupo Mfn2-null, em comparação com oócitos WT (Figura 22 A e C).

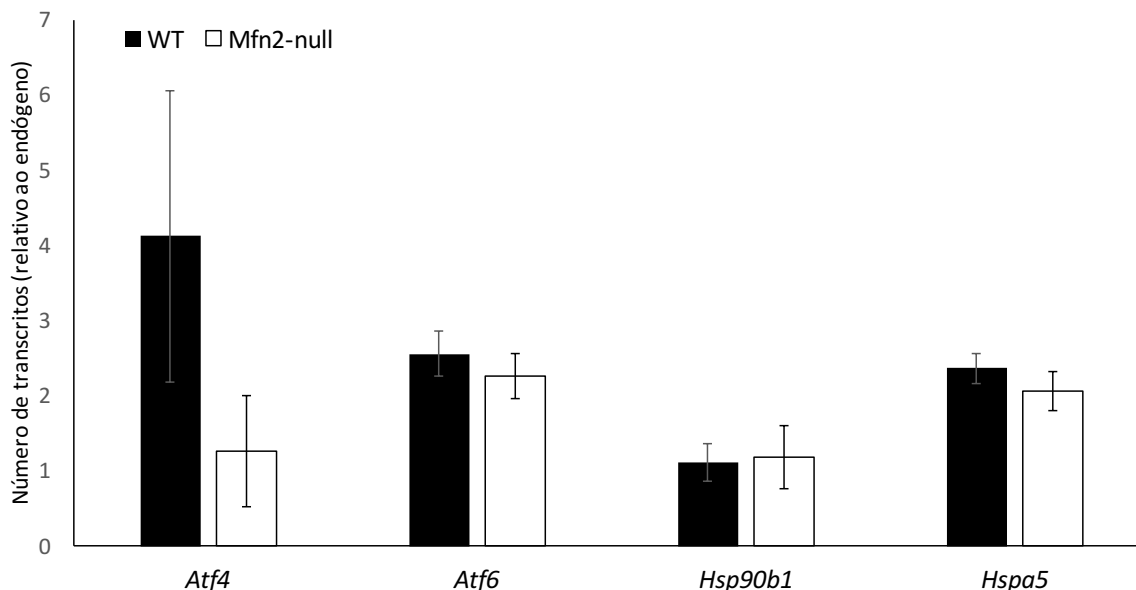


Figura 21. Quantificação de transcritos relacionados ao stress do retículo endoplasmático. Oócitos GV Mfn2-null e WT foram avaliados por qPCR quanto a quantidade de transcritos *Atf4*, *Atf6*, *Hsp90b1* e *Hspa5*. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Utilizaram-se 10 pools de oócitos oriundos de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Uma vez que as MAMs são flexíveis e se adaptam ao estado metabólico das células, mudanças na frequência, distância e comprimento do contato são parâmetros importantes, e não necessariamente compensatórios ou redundantes (BRAVO *et al.*, 2011; CSORDÁS *et al.*, 2006; SOOD *et al.*, 2014). Sendo assim, esses achados demonstram uma particular adaptação das MAMs nos oócitos Mfn2-null. Além disso, esses achados corroboram um recente estudo que demonstrou que oócitos de fêmeas obesas apresentam um maior comprimento de contato entre mitocôndria e RE (ZHAO *et al.*, 2017).

Segundo Zhao *et al.* (2017), o aumento no comprimento do contato entre mitocôndrias e o RE aumenta o *uptake* de cálcio para a mitocôndria e isso por sua vez, resulta em disfunções mitocondriais e apoptose exacerbada em oócitos de fêmeas murinas obesas (HOU *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017). Isso corrobora o nosso dado de inchamento mitocondrial no grupo Mfn2-null (Figura 16), uma vez que o aumento no contato entre o RE e mitocôndrias poderia ter levado ao aumento de Ca^{2+} mitocondrial, o que por sua vez, levou ao inchamento mitocondrial. Entretanto, o autor não analisou a distância entre mitocôndria e RE. Além disso, nesse estudo não foram encontradas alterações na quantidade de transcritos *Mfn2* nos oócitos de fêmeas obesas. Isso pode sugerir então, que as alterações encontradas nas MAMs sejam o principal problema que resulta nas disfunções mitocondriais encontradas nos oócitos de fêmeas obesas e não necessariamente a ausência de uma proteína específica dentre as várias presentes nas MAMs.

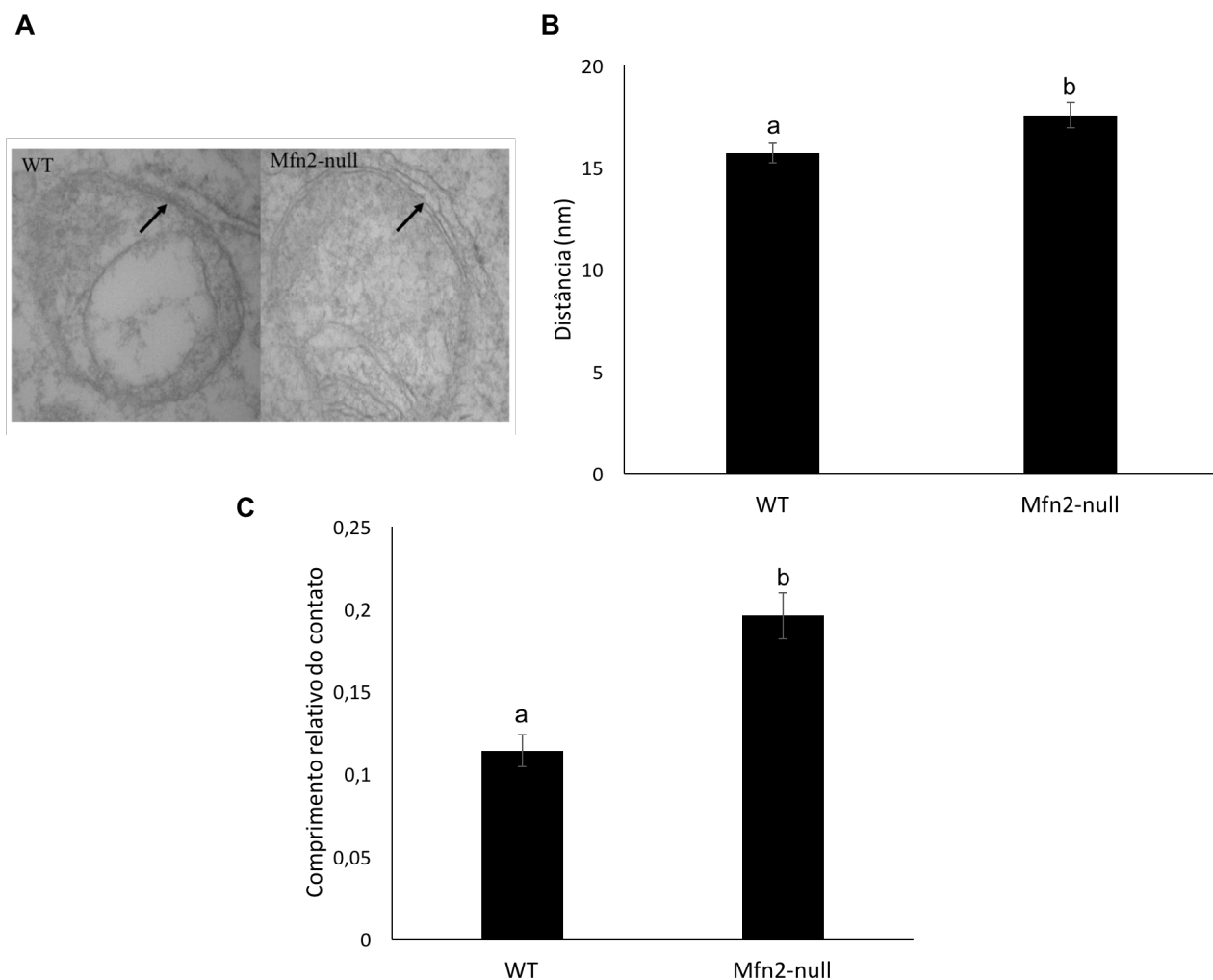


Figura 22. *Contato entre mitocôndria e o retículo endoplasmático.* O contato entre as organelas foi mensurado em imagem com 40kx de aumento. A) Contato entre mitocôndria e retículo endoplasmático de mitocôndrias oocitárias do grupo WT e Mfn2-null. B) Quantificação da distância entre o retículo endoplasmático e uma mitocôndria (nm). C) Quantificação do comprimento relativo do contato entre mitocôndrias e o retículo endoplasmático. Para isso, o valor total do contato foi dividido pelo perímetro mitocondrial, a fim de se evitar um efeito do inchamento mitocondrial na análise. Letras diferentes representam diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos experimentais. Para a análise de distância entre mitocôndria e retículo foram analisados 61 contatos de oócitos do grupo Mfn2-null e 44 contatos do WT. Já para a análise de comprimento do contato, foram analisados 57 contatos de oócitos Mfn2-null e 40 contatos do WT. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Portanto, as alterações na morfologia e no contato entre mitocôndria e o RE encontradas nos oócitos Mfn2-null suportam nossos dados preliminares onde a prole oriunda de oócitos *knockout* condicional para *Mfn2* apresentaram maiores níveis glicêmicos e fornecem possíveis direcionamentos para melhor se entender o efeito do MFN2 no metabolismo de oócitos murinos, assim como, sua relação com síndromes metabólicas maternas.

O *knockout* condicional do *Mfn2* não resulta em alterações na via mitofágica

Apesar da importância do MFN2 para a via mitofágica (CHEN e DORN, 2013; HAILEY *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2012), não encontramos qualquer efeito do *knockout* do *Mfn2* na expressão de genes associados com a mitofagia nos oócitos GV (Figura 23). Análises de quantificação proteica seriam mais adequadas e informativas para se avaliar um possível efeito nesta via, porém, o baixo conteúdo dessas proteínas nos oócitos nos impediu até o momento de realizar tal quantificação por western blot. Tentando solucionar esse problema, utilizamos imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de oócitos WT e *Mfn2*-null para determinar um possível efeito sobre a quantidade de lisossomos e autofagossomos. Todavia, não foi encontrado diferença estatística entre os grupos (Figura 24).

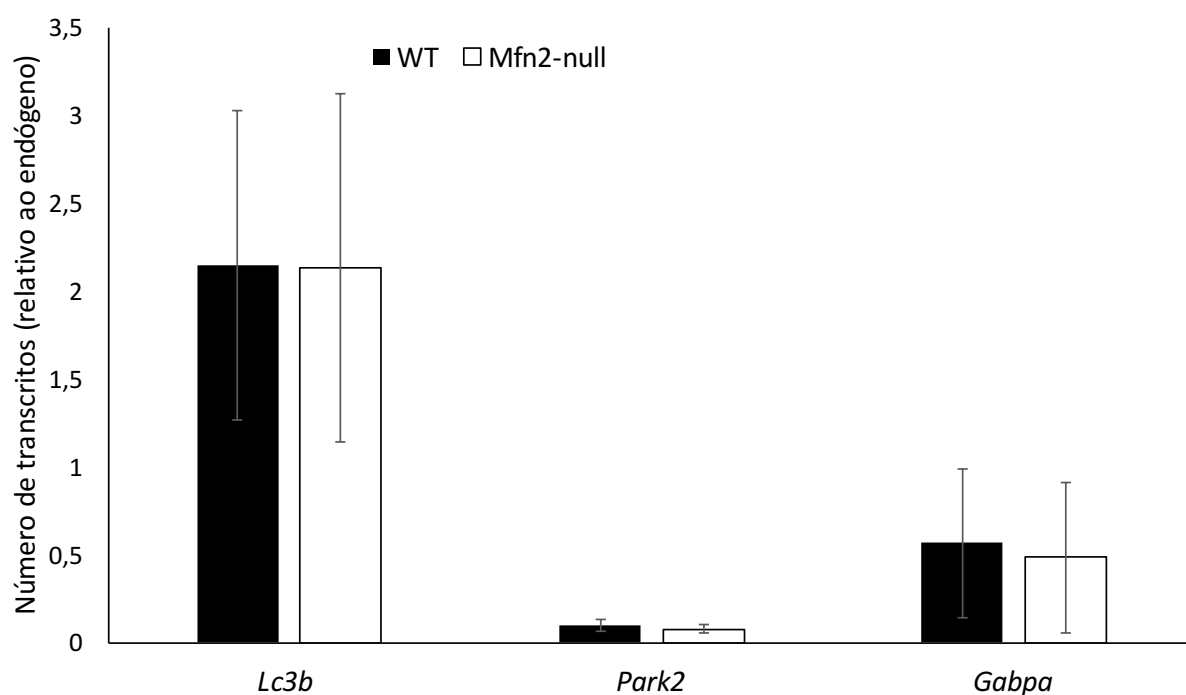


Figura 23. Quantificação de transcritos relacionados à via mitofágica. Oócitos GV *Mfn2*-null e WT foram avaliados quanto a quantidade de transcritos *Lc3b*, *Park2* e *Gabpa* (*GA-Binding Protein Alpha Chain*). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Utilizaram-se 10 pools de oócitos oriundos de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Para investigar mais a fundo um possível efeito do *knockout* do *Mfn2* sobre a ocorrência de mitofagia analisamos a co-localização entre mitocôndrias e autofagossomos (Figura 25). Apesar de não termos encontrado diferença estatística entre os grupos, o grupo *Mfn2*-null apresentou tendência ($P = 0,0627$) de menor co-localização entre mitocôndria e autofagossomo. Sendo assim, o n amostral desse experimento deve ser aumentado a fim de se confirmar este possível efeito do MFN2.

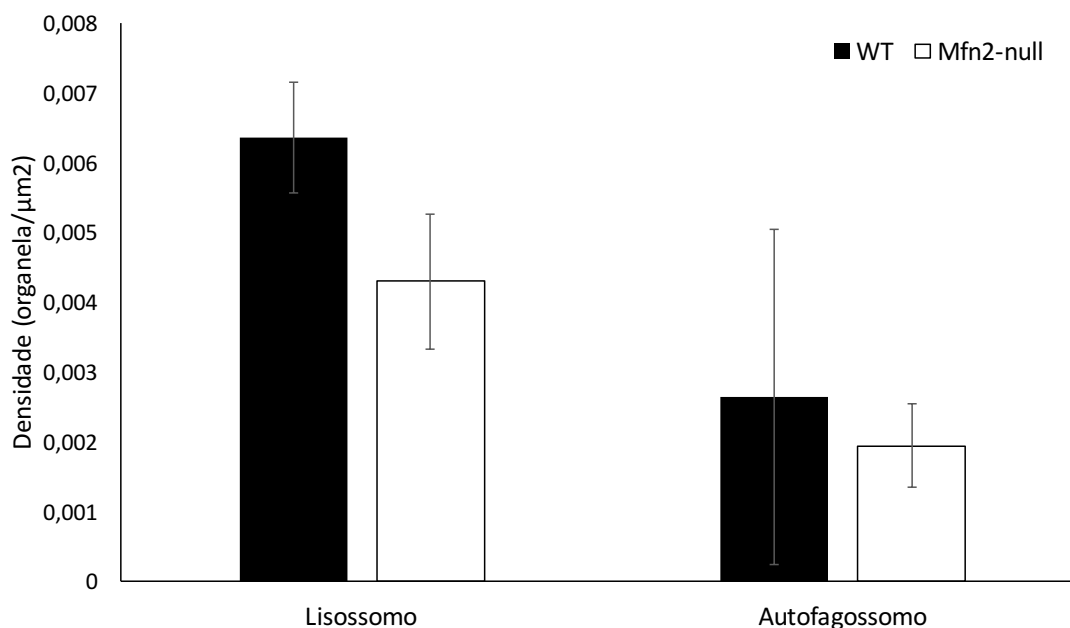


Figura 24. *Quantificação de lisossomos e autofagossomos.* A densidade de lisossomos e autofagossomos foi mensurada em imagens de microscopia eletrônica de transmissão com 20kx de aumento. Para isso, foi verificado o número dessas organelas por foto e este foi posteriormente normalizado pela área de ooplasma considerada. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Foram utilizados para essa análise 8 e 5 cortes de ovários dos grupos WT e Mfn2-null, respectivamente, provenientes de 5 e 4 animais. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

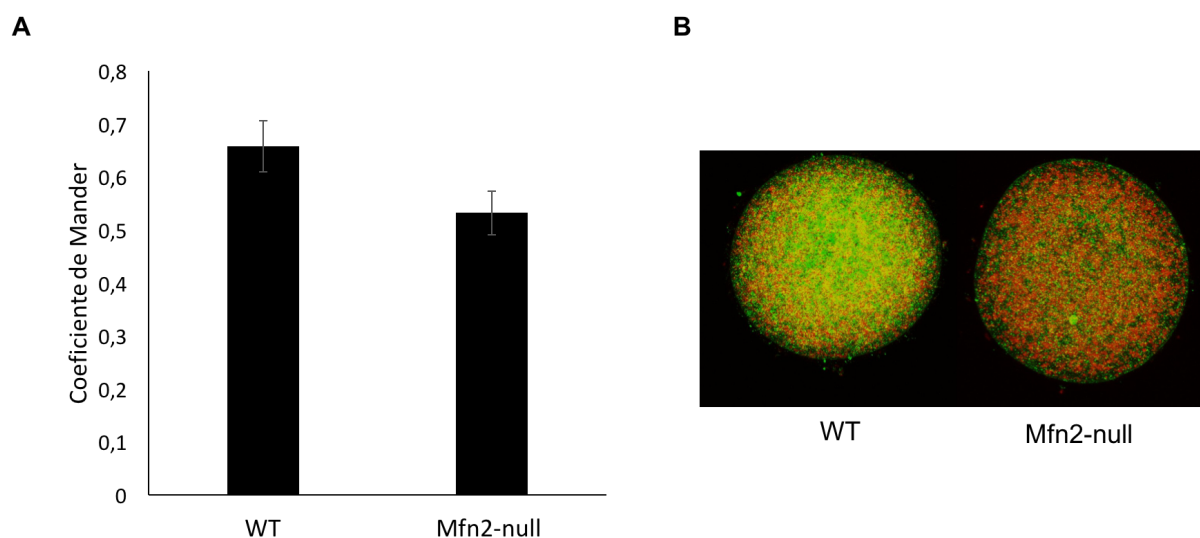


Figura 25. *Co-localização de mitocôndrias e autofagossomos.* Oócitos GV WT e Mfn2-null foram avaliados por imunofluorescência quanto a co-localização de mitocôndrias e autofagossomos. Para isso, determinou-se o coeficiente de Mander que indica de forma diretamente proporcional a co-localização entre duas marcações. O coeficiente de Mander varia de 0 a 1, onde 0 indica a menor co-localização possível e 1 a maior co-localização possível. A) Coeficiente de Mander. B) Imagens da reconstrução 3D de oócitos WT e Mfn2-null. Mitocôndria (vermelho) e autofagossomo (verde). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Utilizaram-se 20 oócitos Mfn2-null e 12 oócitos WT oriundos de pelo menos 2 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Portanto, esse conjunto de dados não é conclusivo quanto ao papel do MFN2 na mitofagia e no envelhecimento oocitário. Como resultado, não conseguimos fornecer evidências até o momento do mecanismo subjacente ao acúmulo de mtDNA NZB em oócitos e na prole como consequência do knockout do *Mfn2*.

O *knockout* condicional do *Mfn2* resulta em alterações no contingente lipídico

Uma vez que a herança de distúrbios metabólicos é comum em progênie oriundas de oócitos com excesso de lipídeos, devido principalmente a obesidade materna (SABEN *et al.*, 2016; BOUDOURES *et al.*, 2014), analisamos o conteúdo lipídico em oócitos *Mfn2*-null e WT. Entretanto, diferente do esperado, os oócitos *Mfn2*-null apresentaram menor conteúdo lipídico que os oócitos WT (Figura 26). Apesar desse resultado não corroborar nossa hipótese inicial ou mesmo a literatura (ZHANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014), a diminuição no conteúdo lipídico pode indicar uma redução na energia nos oócitos para β -oxidação (PACZKOWSKI *et al.*, 2013; DUNNING *et al.*, 2010).

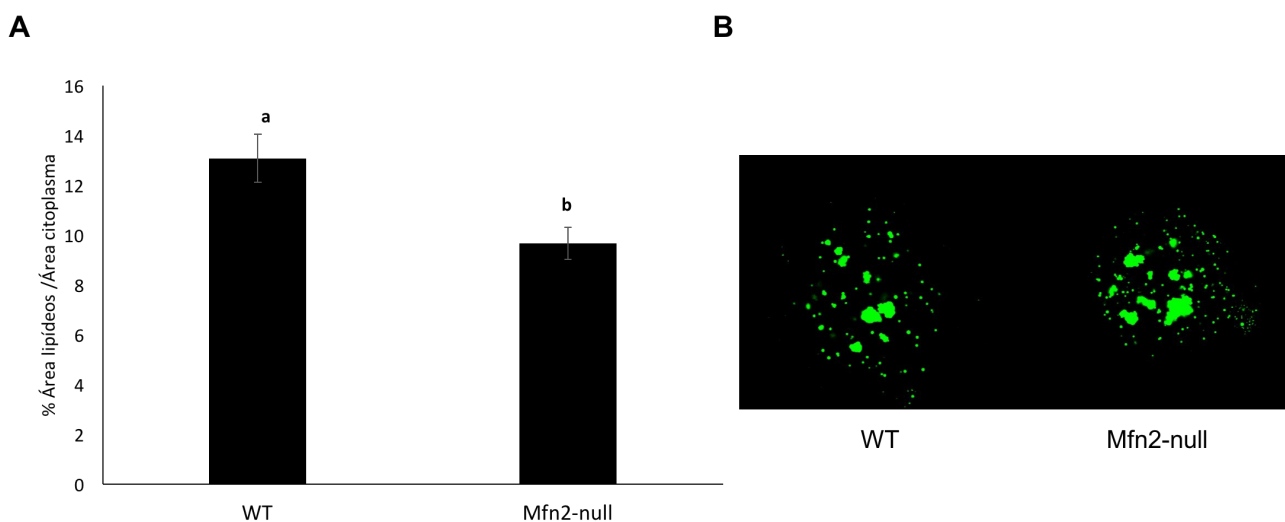


Figura 26. Conteúdo lipídico em oócitos ovulados. A) Foi calculada a porcentagem da área do ooplasma ocupada por gotas lipídicas. Nota-se que o grupo *Mfn2*-null apresentou um menor contingente lipídico quando comparado ao WT. B) Oócitos WT e *Mfn2*-null corados com o corante Bodipy 493/503 (Thermo Fisher Scientific), o qual marca as gotas lipídicas. Letras diferentes representam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Utilizaram-se 37 oócitos *Mfn2*-null e 24 WT de mais de 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

A fim de investigar essa hipótese, investigamos se o *knockout* condicional do *Mfn2* no oócito foi capaz de alterar a síntese e o metabolismo lipídico nas células do cumulus (principal fonte de energia proveniente da β -oxidação no COC). Porém, não encontramos diferença (Figura 27 A) entre os grupos para genes relacionados com a síntese lipídica: *Acaca* (*Acetyl-CoA carboxylase 1*), *Fasn* (*Fatty acid synthase*) e *Srebp1* (*Sterol regulatory element-binding protein 1*); a β -oxidação: *Cp1a* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1a*), *Cpt1b* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1b*), *Cpt1c* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1c*) e *Cpt2* (*Carnitine Palmitoyltransferase 2*); e o acúmulo lipídico: *Plin2* (*Perilipin 2*). Sendo assim, caso exista alguma alteração a nível transcricional nessas vias, elas se

encontram no oócito e não nas células do cumulus. Em futuros experimentos, planejamos realizar as mesmas análises em oócitos ovulados com o intuito de elucidar o mecanismo subjacente a diminuição do conteúdo lipídico nos oócitos *Mfn2*-null. Além disso, não encontramos nenhum efeito quanto ao nível de transcritos relacionados a dinâmica mitocondrial (Figura 27 B).

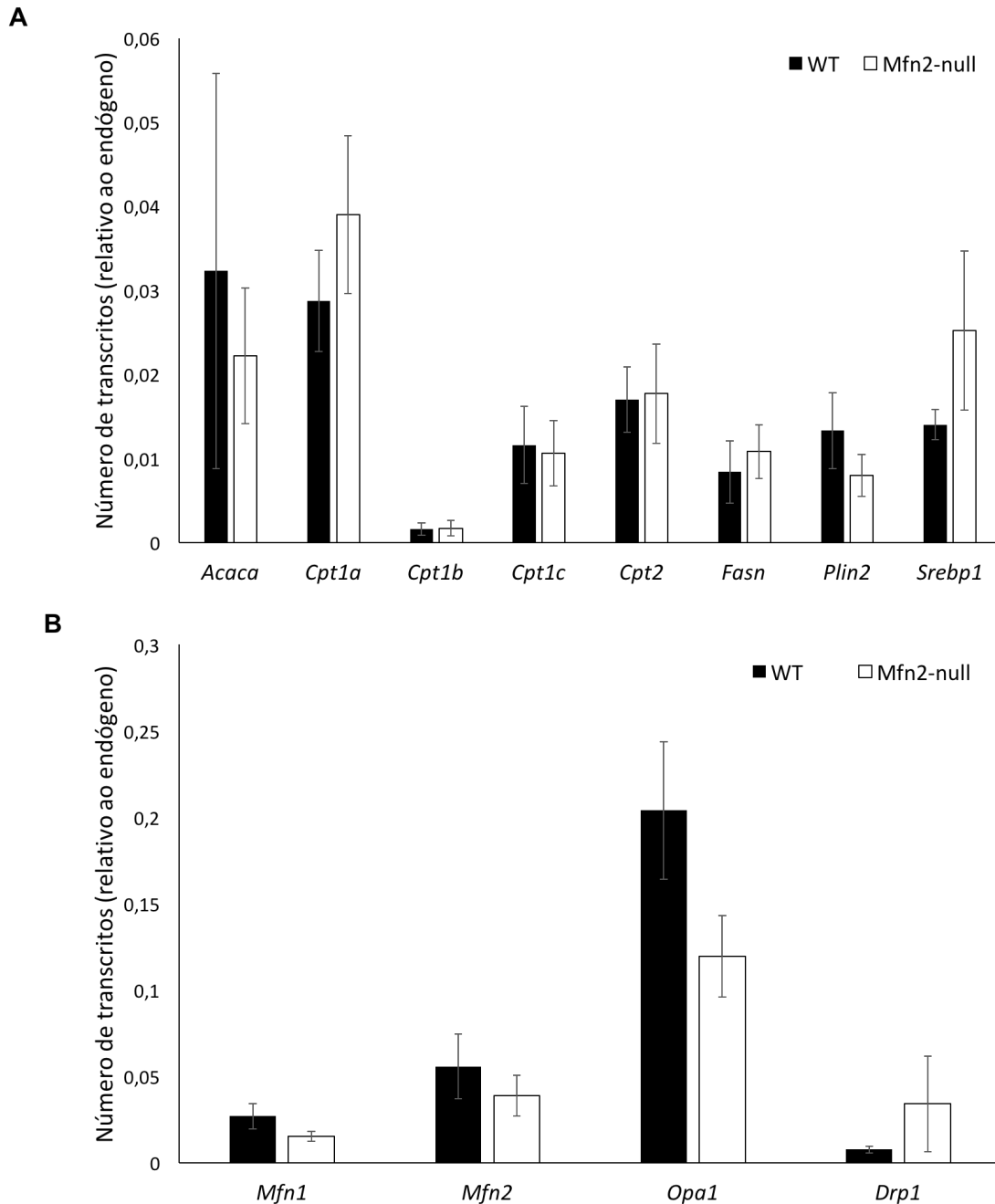


Figura 27. *Quantificação de transcritos nas células do cumulus.* As células do cumulus foram isoladas de oócitos ovulados dos grupos WT e *Mfn2*-null. Foram analisados genes relacionados a A) Síntese lipídica, β -oxidação e acúmulo lipídico, e B) Dinâmica mitocondrial. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Utilizaram-se pelo menos 3 pools de CC oriundos de pelo menos 3 fêmeas diferentes para a realização dessa análise. Valor demonstrado como média \pm erro padrão.

Em conjunto, esses achados demonstram que o *knockout* do *Mfn2* no oócito resulta em alterações metabólicas na prole (Figura 11, 12 e 13). Todavia, isso não é devido ao aumento do conteúdo lipídico dos oócitos ovulados (Figura 26), mas muito provavelmente, devido as alterações mitocondriais observadas (Figura 16, 17 e 22). Intrigantemente, oócitos de fêmeas obesas apresentam as mesmas alterações na morfologia mitocondrial, assim como, resultam em prole com alterações metabólicas (SABEN et al., 2016). Porém, oócitos de fêmeas obesas apresentam aumento no conteúdo lipídico (WU et al., 2010). Isso pode nos levar a crer que o principal problema que leva a herança de síndromes metabólicas em fêmeas obesas é a alteração na morfologia, função e contato entre mitocôndria e retículo, não o aumento lipídico por si só. Sendo assim, propomos que tanto o aumento no conteúdo lipídico quanto o *knockout* do *Mfn2* resultam em alteração mitocondriais e/ou no retículo endoplasmático que explicam os efeitos sobre a prole. Todavia, o mecanismo molecular pelo qual isso se dá ainda carece de elucidação.

CONCLUSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do *knockout* do *Mfn2* sob a mitocôndria, o RE e a mitofagia em oócitos murinos a fim de se elucidar um possível mecanismo que explicasse uma possível anormalidade metabólica na prole. Com base no conjunto de resultados apresentados, as seguintes conclusões podem ser feitas:

No que concerne ao efeito sob a mitocôndria:

- O MFN2 é importante para a manutenção da arquitetura mitocondrial, sendo que, sua ablação resulta em fenótipo de inchamento mitocondrial e alteração na morfologia das cristas.
- O *knockout* do *Mfn2* não resultou em alterações na bioenergética mitocondrial em oócitos murinos imaturos, mas sim, em oócitos ovulados.

No que concerne ao efeito sob o RE:

- O MFN2 é importante para a manutenção e arquitetura das MAMs. Sendo que, sua ablação resulta em uma maior distância entre mitocôndria e o RE, assim como, em maior comprimento do contato entre as organelas.
- O *knockout* do *Mfn2* não resultou em estresse do RE.

No que concerne ao efeito sob a competência oocitária:

- O *knockout* do *Mfn2* não resultou em alterações na competência oocitária.

No que concerne ao efeito sob o metabolismo lipídico:

- O *knockout* do *Mfn2* no oócito resultou em progênie com metabolismo alterado da glicose.
- O *knockout* do *Mfn2* resultou em diminuição no conteúdo lipídico oocitário.
- O *knockout* do *Mfn2* não altera a síntese, o metabolismo e o acúmulo lipídico nas células do cumulus.

No que concerne ao efeito sob a mitofagia:

- O *knockout* do *Mfn2* no oócito não afetou a incidência de mitofagia.

Sendo assim, esses achados demonstram que o *knockout* condicional do *Mfn2* no oócito resulta em alterações metabólicas na prole devido, muito provavelmente, a alterações na morfologia, função e contato entre mitocôndria e RE, e não devido ao aumento lipídico por si só como suposto pela literatura e na hipótese inicial deste trabalho. Todavia, o mecanismo molecular pelo qual isso ocorre ainda carece de elucidação. Ainda, demonstramos aqui que o *knockout* condicional do *Mfn2* pode vir

a ser um bom modelo para o estudo da herança de síndromes metabólicas considerando o número alarmante e em constante crescimento de pessoas afetadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALEXANDER, C. *et al.* **OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28.** *Nature genetics*, v. 26, n. 2, p. 211–215, 2000.
- ARCHER, S. L. **Mitochondrial Dynamics - mitochondrial fission and fusion in human diseases.** *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 23, p. 2236–2251, 2013.
- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. *et al.* **Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic β -cell line INS-1.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 3, p. 1659–1664, 1997.
- BACH, D. *et al.* **Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle.** *Diabetes*, v. 54, n. 9, p. 2685–2693, 2005.
- BACH, D. *et al.* **Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 19, p. 17190–17197, 2003.
- BEN-MEIR, A. *et al.* **Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging.** *Aging Cell*, v. 14, n. 5, p. 887–895, 2015.
- BEREITER-HAHN, J. e VÖTH, M. **Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria.** *Microscopy Research and Technique*, v. 27, n. 3, p. 198–219, 1994.
- BOLENDER, N. *et al.* **Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins.** *EMBO reports*, v. 9, n. 1, p. 42–9, 2008.
- BOUDOURES, A. L. *et al.* **High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse : Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation / Brain Defects.** *Theriogenology*, v. 7, n. 7, p. 959–965, 2014.
- BOUTANT, M. *et al.* **Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function.** *The EMBO journal*, v. 36, n. 11, p. 1543–1558, 2017.
- BRATIC, A. e LARSSON, N. G. **The role of mitochondria in aging.** *Journal of Clinical Investigation*. 2013.
- BRAVO, R. *et al.* **Increased ER – mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress** *Increased ER – mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress.* 2011.
- CAGALINEC, M. *et al.* **Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons.** *Journal of cell science*, v. 126, n. Pt 10, p. 2187–97, 2013.
- CARNIO, S. *et al.* **Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging.** *Cell Reports*, v. 8, n. 5, p. 1509–1521, 2014.
- CARTONI, R. *et al.* **Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise.** *J Physiol*, v. 567, n. Pt 1, p. 349–358, 2005.
- CHAN, D. C. **Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health.** *Annual Review of Genetics*, v. 46, n. 1, p. 120830114430006, 2011.

CHAN, N. C. *et al.* **Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy.** *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 9, p. 1726–1737, 2011.

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.

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.* **Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 28, p. 26185–26192, 2005.

CHEN, H. *et al.* **Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum.** *Cell*, v. 130, n. 3, p. 548–562, 2007.

CHEN, K. *et al.* **Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders.** *Nature cell biology*, v. 6, n. 9, p. 872–883, 2004.

CHEN, Y. e DORN, G. W. **PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria.** *Science*, v. 340, n. 6131, p. 471–5, 2013.

COLLADO-FERNANDEZ, E. *et al.* **Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals.** *International Journal of Developmental Biology*, v. 56, n. 10–12, p. 799–808, 2012.

CSORDÁS, G. *et al.* **Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria.** *Journal of Cell Biology*, v. 174, n. 7, p. 915–921, 2006.

DAI, Y. *et al.* **Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation.** *Human molecular genetics*, v. 23, n. 3, p. 637–47, Fev 2014.

DE BRITO, O. M. e SCORRANO, L. **Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria.** *Nature*, v. 456, n. 7222, p. 605–610, 2008.

DE VRIES, W. N. *et al.* **Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes.** *Genesis*, v. 26, n. 2, p. 110–2, Fev 2000.

DELETTRE, C. *et al.* **Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.** *Nature genetics*, v. 26, n. 2, p. 207–210, 2000.

DONG, H. e CZAJA, M. J. **Regulation of lipid droplets by autophagy.** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 22, n. 6, p. 234–240, 2011.

DONG, J. *et al.* **Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.** *Nature*, v. 383, n. 6600, p. 531–535, 1996.

DOWNS, S. M. *et al.* **Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 76, n. 9, p. 844–853, 2009.

DUARTE, A. *et al.* **Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.

DUNNING, K. R. *et al.* **Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development.** *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 6, p. 909–918, 2010.

DUNNING, K. R. *et al.* **Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

EURA, Y. *et al.* **Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating**

mitofusin (Mfn) protein function. Journal of cell science, v. 119, n. Pt 23, p. 4913–25, 2006.

FALKENBERG, M. *et al.* **DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.** Annual review of biochemistry, v. 76, p. 679–99, 2007.

FAN, W. *et al.* **A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations.** Science, v. 319, n. 5865, p. 958–62, Feb 2008.

FRANK, S. *et al.* **The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis.** Developmental Cell, v. 1, n. 4, p. 515–525, 2001.

FREYER, C. *et al.* **Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission.** Nature genetics, v. 44, n. 11, p. 1282–5, Nov 2012.

GARDNER, D. K. e LEESE, H. J. **Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro.** Journal of reproduction and fertility, v. 88, n. 1, p. 361–368, 1990.

GELMETTI, V. *et al.* **PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation.** Autophagy, v. 13, n. 4, p. 654–669, 2017.

GILKERSON, R. W. *et al.* **Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition.** Human molecular genetics, v. 21, n. 5, p. 978–90, 2012.

GOMES, L. C. **During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.** Nature cell biology, v. 13, n. 5, p. 589–98, 2011.

GULYAS, B. J e Mattison D. R. **Degeneration of Mouse Oocytes in Response to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** Anat Rec., v. 193 n.4, p. 863-82, 1979.

HAILEY, D. W. *et al.* **Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation.** Cell, v. 141, n. 4, p. 656–667, 2010.

HAMASAKI, M. *et al.* **Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites.** Nature, v. 495, n. 7441, p. 389–393, 2013.

HAN, Z. *et al.* **Role of glucose in cloned mouse embryo development.** p. 798–809, 2018.

HAUSWIRTH, W. W. e 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. 4686–4690, 1982.

HERNANDEZ-ALVAREZ, M. I. *et al.* **Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1{alpha}/Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity.** Diabetes Care, v. 33, n. 3, p. 645–651, 2010.

HOTAMISLIGIL, G. S. **Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease.** Cell, 2010.

HOU, Y. *et al.* **Both diet and gene mutation induced obesity affect oocyte quality in mice.** Nature Publishing Group, p.1–10, 2016.

HYDE, B. B. *et al.* **Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics.** Seminars in Cell and

Developmental Biology, 2010.

IGOSHEVA, N. *et al.* **Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes.** PLoS ONE, v. 5, n. 4, 2010.

ISHIHARA, N. *et al.* **Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity.** Journal of Cell Science, v. 117, n. Pt 26, p. 6535–6546, 2004.

JANSEN, R. P. e DE BOER, K. **The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate.** Molecular and cellular endocrinology, v. 145, n. 1–2, p. 81–8, Out 1998.

JIMENEZ, L. *et al.* **Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation.** Journal of cell science, v. 127, n. Pt 4, p. 719–26, 2014.

JIN, S. M. *et al.* **Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL.** Journal of Cell Biology, v. 191, n. 5, p. 933–942, 2010.

KANE, L. A. *et al.* **PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate parkin E3 ubiquitin ligase activity.** Journal of Cell Biology, v. 205, n. 2, p. 143–153, 2014.

KELLEY, D. E. *et al.* **Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes.** Diabetes, v. 51, n. 10, p. 2944–2950, 2002.

KONDAPALLI, C. *et al.* **PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65.** Open Biology, v. 2, n. 5, p. 120080–120080, 2012.

KONING, A. J. *et al.* **DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells.** Cell Motility and the Cytoskeleton, v. 25, n. 2, p. 111–128, 1993.

KOSHIBA, T. **Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes.** Science, v. 305, n. 5685, p. 858–862, 2004.

KOYANO, F. *et al.* **Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin.** Nature, v. 510, n. 7503, p. 162–6, 2014.

KROEMER, G.. **Autophagy: A druggable process that is deregulated in aging and human disease.** Journal of Clinical Investigation, 2015.

KUJOTH, G. C. *et al.* **Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging.** Science, v. 309, n. 5733, p. 481–4, Jul 2005.

KUSHNIR, V. A. *et al.* **Reproductive aging is associated with decreased mitochondrial abundance and altered structure in murine oocytes.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 29, n. 7, p. 637–642, 2012.

KUZNETSOV, A. V. e MARGREITER, R. **Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity.** International Journal of Molecular Sciences, 2009.

LEBOUCHER, G. P. *et al.* **Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis.** Molecular Cell, v. 47, n. 4, p. 547–557, 2012.

LEE, S. *et al.* **Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons.** Human Molecular Genetics, v. 21, n. 22, p. 4827–4835, 2012.

LEESE, H. J. e BARTON, A. M. **Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells.** Journal of Experimental Zoology, v. 234, n. 2, p. 231–236, 1985.

LIESA, M. *et al.* **Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease.** Physiological Reviews, v. 89, n. 3, p. 799–845, 2009.

LIESA, M. e SHIRIHAI, O. S. **Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure.** Cell Metabolism, 2013.

LILL, R. e MÜHLENHOFF, U. **Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases.** Annual review of biochemistry, v. 77, p. 669–700, 2008.

LIONETTI, L. *et al.* **High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria.** PLoS ONE, v. 9, n. 3, 2014.

LIU, C. *et al.* **Mitofusin 2 decreases intracellular lipids in macrophages by regulating peroxisome proliferator-activated receptor- γ .** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 450, n. 1, p. 500–506, 2014.

LOISEAU, D. *et al.* **Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease.** Annals of Neurology, v. 61, n. 4, p. 315–323, 2007.

MACABELLI, C. *et al.* **Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer.** PLoS ONE, v. 9, n. 3, 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.

MASIERO, E. *et al.* **Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass.** Cell Metabolism, v. 10, n. 6, p. 507–515, 2009.

MASIERO, E. e SANDRI, M. **Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles.** Autophagy, 2010.

MAY-PANLOUP, P. *et al.* **Ovarian ageing: The role of mitochondria in oocytes and follicles.** Human Reproduction Update, NULL, v. 22, n. 6, p. 725–743, 2016.

MCCOY, M. K. e COOKSON, M. R. **Mitochondrial quality control and dynamics in Parkinson's disease.** Antioxidants & redox signaling, v. 16, n. 9, p. 869–882, 2012.

MCGARRY, J. D; e BROWN, N. F. **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** European journal of biochemistry / FEBS, v. 244, n. 1, p. 1–14, 1997.

MELDRUM, D. R. *et al.* **Ageing and the environment affect gamete and embryo potential: Can we intervene?** Fertility and Sterility, v. 105, n. 3, p. 548–559, 2016.

MINGRONE, G. *et al.* **Could the low level of expression of the gene encoding skeletal muscle mitofusin-2 account for the metabolic inflexibility of obesity?** Diabetologia, v. 48, n. 10, p. 2108–2114, 2005.

MISHRA, P. *et al.* **Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation.** Cell Metabolism, v. 19, n. 4, p. 630–641, 2014.

MISHRA, P. e CHAN, D. C. **Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 10, p. 634–646, 2014.

MOURIER, A. *et al.* **Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels.** Journal of Cell

Biology, v. 208, n. 4, p. 429–442, 2015.

MUNHOZ, J. P. *et al.* **Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK.** EMBO Journal, v. 33, n. 2, p. 171, 2014.

NAGY, A. *et al.* **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.** 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

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

NARENDRA, D. P. *et al.* **PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin.** PLoS Biology, v. 8, n. 1, 2010.

NARENDRA, D. P. e YOULE, R. J. **Targeting Mitochondrial Dysfunction: Role for PINK1 and Parkin in Mitochondrial Quality Control.** Antioxidants & redox signaling, v. 14, n. 10, p. 1929–1938, 2011.

NGOH, G. A. *et al.* **Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress.** Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 24, p. 20321–20332, 2012.

NGUYEN, T. N. *et al.* **Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy.** Trends in Cell Biology, 2016.

NI, H. M. *et al.* **Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control.** Redox Biology, v. 4, p. 6–13, 2015.

NIE, Q. *et al.* **Mitofusin 2 deficiency leads to oxidative stress that contributes to insulin resistance in rat skeletal muscle cells.** Molecular Biology Reports, v. 41, n. 10, p. 6975–6983, 2014.

OKATSU, K. *et al.* **Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor.** Journal of Cell Biology, v. 209, n. 1, p. 111–128, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Obesity and overweig.** Obesity and overweig, 2018.

PACZKOWSKI, M. *et al.* **Comparative importance of fatty acid beta-oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus oocyte complexes.** Biology of reproduction, v. 88, n. 5, p. 111, 2013.

PALIKARAS, K. *et al.* **Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in C. elegans.** Nature, v. 521, n. 7553, p. 525–528, 2015.

PAPANICOLAOU, K. N. *et al.* **Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death.** AJP: Heart and Circulatory Physiology, v. 302, n. 1, p. H167–H179, 2012.

PAPANICOLAOU, K. N. *et al.* **Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes.** Molecular and cellular biology, v. 31, n. 6, p. 1309–28, 2011.

PERNAS, L. e SCORRANO, L. **Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function.** Annual review of physiology, v. 78, n. 1, p. annurev-physiol-021115-105011, 2015.

PHAM, A. H. *et al.* **Loss of Mfn2 results in progressive, retrograde degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal circuit.** Human Molecular Genetics, v. 21, n. 22, p. 4817–4826, 2012.

PICH, S. *et al.* **The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system.** *Human Molecular Genetics*, v. 14, n. 11, p. 1405–1415, 2005.

PIKE, L. S. *et al.* **Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells.** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1807, n. 6, p. 726–731, 2011.

POULTON, J. *et al.* **Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them.** *PLoS genetics*, v. 6, n. 8, Ago 2010.

PYAKUREL, A. *et al.* **Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis.** *Molecular Cell*, v. 58, n. 2, p. 244–254, 2015.

RAMBAGS, B. P. B. *et al.* **Therigenology Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro.** *Therigenology*, v. 81, n. 7, p. 959–965, 2014.

RAMBOLD, A. S. *et al.* **Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 25, p. 10190–10195, 2011.

ROJO, M. *et al.* **Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo.** *J Cell Sci*, v. 115, n. Pt 8, p. 1663–1674, 2002.

RORBACH, J. *et al.* **How do mammalian mitochondria synthesize proteins?** *Biochemical Society transactions*, v. 35, p. 1290–1291, 2007.

ROSSIGNOL, R. *et al.* **Energy substrate modulates mitochondrial structures and oxidative capacity in cancer cells.** *Cancer Research*, v. 64, p. 985–993, 2004.

ROWLAND, A. e VOELTZ, G. K. **Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 10, p. 607–625, 2012.

RUDERMAN, N. B. *et al.* **Minireview: Malonyl CoA, AMP-Activated Protein Kinase, and Adiposity.** *Endocrinology*, 2003.

RUTTER, G. A. e PINTON, P.. **Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in insulin signaling.** *Diabetes*, v. 63, n. 10, p. 3163–3165, 2014.

RYAN, J. J. *et al.* **PGC1A-mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 187, n. 8, p. 865–878, 2013.

SABEN, J. L. *et al.* **Mitochondrial Dysfunction via Germline Changes across Three Generations Maternal Metabolic Syndrome Programs Mitochondrial Dysfunction via Germline Changes across Three Generations.** *CellReports*, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.

SAITO, T. *et al.* **Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice.** *Biology of reproduction*, v. 50, n. 2, p. 266–70, 1994.

SALMINEN, A. e KAARNIRANTA, K. **Regulation of the aging process by autophagy.** *Trends in Molecular Medicine*, 2009.

SANTEL, A. **Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells.** *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 13, p. 2763–2774, 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. 2031–2037, 2007.

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

SCHAFER, S. *et al.* **Morphological-cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondria in isolated human oocytes in the reproductive age.** v. 2, n. 12, p. 951–958, 1996.

SCHEWE, D. M. e AGUIRRE-GHISO, J. A. **ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 30, p. 10519–10524, 2008.

SCHNEEBERGER, M. *et al.* **Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance.** *Cell*, v. 155, n. 1, p. 172–187, 2013.

SCHON, E. A. *et al.* **Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations.** *Nat Rev Genet*, v. 13, n. 12, p. 878–890, 2012.

SCHREPFER, E. e SCORRANO, L. **Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism.** *Molecular Cell*, v. 61, n. 5, p. 683–694, 2016.

SEBASTIÁN, D. *et al.* **Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway.** *The EMBO Journal*, v. 35, n. 15, p. e201593084, 2016.

SEBASTIÁN, D. *et al.* **Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 14, p. 5523–8, 2012.

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, 2012.

SHIBA-FUKUSHIMA, K. *et al.* **PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy.** *Scientific reports*, v. 2, p. 1002, 2012.

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

SHUTT, T. *et al.* **The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion.** *EMBO reports*, v. 13, n. 10, p. 909–15, 2012.

SILVA RAMOS, E. *et al.* **Bioenergetic roles of mitochondrial fusion.** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1857, n. 8, p. 1277–1283, 2016.

SIMSEK-DURAN, F. *et al.* **Age-Associated Metabolic and Morphologic Changes in Mitochondria of Individual Mouse and Hamster Oocytes.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 2013.

SONG, W. *et al.* **Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility.** *BioMed research international*, v. 2014, p. 981867, 2014.

SOOD, A. *et al.* **A Mitofusin-2-dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, v. 111, n. 45, p. 16017–16022, 2014.

STEWART, J. B. e LARSSON, N. **Keeping mtDNA in shape between generations.** PLoS genetics, v. 10, n. 10, p. e1004670, 2014.

STEWART, J. B. *et al.* **Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease.** Nat Rev Genet, v. 9, n. 9, p. 657–662, 2008.

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

STURMEY, R. G. *et al.* **Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development.** Reproduction in domestic animals, v. 44 Suppl 3, p. 50–8, 2009.

SU, Y. *et al.* **Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function : Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism.** Semin Reprod Med., v.27, n.1, p.32–42, 2009.

SUEN, D. *et al.* **Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 26, p. 11835–40, 2010.

SUN, Q. *et al.* **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. 1014–20, 2008.

TATSUTA, T. e LANGER, T. **Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing.** The EMBO journal, v. 27, n. 2, p. 306–14, 2008.

TOLEDO, F. G. S. *et al.* **Changes Induced by Physical Activity and Weight Loss in the Morphology of Intermyoibrillar Mitochondria in Obese Men and Women.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism , v. 91, n. 8, p. 3224–3227, 2006.

TRIFUNOVIC, A. *et al.* **Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase.** Nature, v. 429, n. 6990, p. 417–23, Maio 2004.

TUBBS, E. *et al.* **Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance.** Diabetes, v. 63, n. 10, p. 3279–3294, 2014.

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

VAN BLERKOM, Jonathan. **Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence.** Mitochondrion. [S.l: s.n.], 2011

WAI, T. *et al.* **The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes.** v. 40, n. 12, p. 1484–1488, 2008.

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. *et al.* **Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease.** Cold spring harbor perspectives in biology, v. 5, n. 11, p. a021220, 2013.

WALLACE, D. C e CHALKIA, D. **Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease.** Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 5, n. 11, p. a021220, Nov 2013.

WANG, Q. *et al.* **Maternal Diabetes Causes Mitochondrial Dysfunction and Meiotic Defects in Murine Oocytes.** Mol Endocrinol, v. 23, n. October, p. 1603–1612, 2009.

WASILEWSKI, M. *et al.* **Optic atrophy 1-dependent mitochondrial remodeling controls steroidogenesis in trophoblasts.** Current Biology, v. 22, n. 13, p. 1228–1234, 2012.

WILDING, M. *et al.* **Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos.** Human Reproduction, v. 16, n. 5, p. 909–917, 2001.

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.

WU, L. L. Y. *et al.* **High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus - Oocyte complexes and decreased fertilization rates.** Endocrinology, NULL, v. 151, n. 11, p. 5438–5445, 2010.

XI-RUI, C. **Over- expression of Mitofusin 2 Gene (Mfn2) Has Effect on Mouse (Mus musculus) Oocytes In vitro Maturation.** v. 23, n. 31172280, 2015.

XU, W. *et al.* **Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response.** Nature cell biology, v. 6, n. 11, p. 1129–1134, 2004.

YAMANO, K. e YOULE, R. J. **PINK1 is degraded through the N-end rule pathway.** Autophagy, v. 9, n. 11, p. 1758–1769, 2013.

YAN, C. *et al.* **Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function.** Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), v. 15, n. 6, p. 854–866, 2001.

YOULE, R. J. e NARENDRA, D. P. **Mechanisms of mitophagy.** Nature reviews. Molecular cell biology, v. 12, n. 1, p. 9–14, 2011.

ZHANG, J. *et al.* **Mitofusin-2 is required for mouse oocyte meiotic maturation.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, p. 30970, 2016.

ZHANG, X. *et al.* **Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles.** Cell research, v. 16, n. 10, p. 841–850, 2006.

ZHANG, X. *et al.* **Mitofusion-2-mediated alleviation of insulin resistance in rats through reduction in lipid intermediate accumulation in skeletal muscle.** Journal of Biomedical Science, v. 20, n. 1, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* **Systems Biology in Reproductive Medicine Dual effects of molybdenum on mouse oocyte quality and ovarian oxidative stress Dual effects of molybdenum on mouse oocyte quality and ovarian.** v. 6368, 2013.

ZHAO, L. *et al.* **Enriched endoplasmic reticulum- mitochondria interactions result in mitochondrial dysfunction and apoptosis in oocytes from obese mice.** p. 1–8, 2017.

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. 1020–1031, 2015.

ZÜCHNER, S. *et al.* **Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A.** *Nature genetics*, v. 36, n. 5, p. 449–451, 2004.