

JOSÉ DJACI AUGUSTO NETO

**Deleção oócito-específica da *Rad51* em murinos e seu
impacto sobre a função mitocondrial e a fertilidade**

São Carlos – SP

2020

JOSÉ DJACI AUGUSTO NETO

Deleção oócito-específica da *Rad51* em murinos e seu impacto sobre a função mitocondrial e a fertilidade

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

Departamento:

Genética e Evolução

Área de concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos – SP

2020



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

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato José Djaci Augusto Neto, realizada em 14/02/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Perecin Nociti (USP)

Prof. Dr. Juliano Rodrigues Sangalli (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

*A Elane e Gabriel, pelo apoio e amor
incondicional em cada fase dessa etapa.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e carinho. Aos meus pais, irmãos e sobrinhos pela compreensão. Aos meus avós, José Djaci Augusto, Antônia Barros e Maria Telma Arrais, por ter me apresentado o mais puro e verdadeiro amor. Obrigado pelo apoio.

Aos amigos incríveis que fiz na cidade de São Carlos; Pelé, Gustavo, Angélica, Maria, Paula, Katarina, Layse, Rinaldi, Scub, obrigado por me acompanhar tão de perto, quando minha família não estava presente. Obrigado pelas conversas, abraços e carinho compartilhado. Nossa amizade e momentos estarão para sempre em meu coração.

Aos meus companheiros de laboratório, Carol, Katiane, Fabrícia, Angélica, Mateus, Rachel, Renan, Jaiane, Lindomar pelo auxílio em meus experimentos, por muitas vezes ter sido meu refúgio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti que me auxiliou nos experimentos, durante o desenvolvimento desta dissertação e por ter fortalecido minha relação com a sensacional organela celular conhecida como mitocôndria. Obrigado pelo apoio.

Aos professores Rodrigo A. P. Martins da UFRJ e ao Pierre-Olivier Frappart da Universität Ulm, pela doação do modelo loxP da Rad51.

A professora Nadja Cristhina de S. Pinto pelas contribuições no desenvolvimento ao presente trabalho.

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.

À FAPESP (processo n° 2017/04372-0) pelo financiamento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Eu não estou interessado em nenhuma teoria, amar e mudar as coisas me interessa mais [...]”

Belchior 1976

AUGUSTO, J. D. N. Oocyte-specific deletion of *Rad51* in mice and its impact on mitochondrial function and fertility. [Deleção oócito-específica da *Rad51* em murinos e seu impacto sobre a função mitocondrial e a fertilidade]. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

RESUMO

Um dos primeiros sinais do envelhecimento em humanos é o declínio na fertilidade feminina acompanhado de uma redução da expressão de proteínas que integram a maquinaria de reparo de quebras de fita dupla (*Double Strand Breaks* - DSBs), entre elas BRCA1, ATM, MRE11 e RAD51. Assim, a deficiência dessas proteínas pode resultar em baixa qualidade oocitária, com separação precoce das cromátides irmãs, aneuploidias, quebras cromossômicas, além de susceptibilidade aumentada a apoptose. Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de realizar o nocaute oócito específico da *Rad51* em murinos e testar o seu efeito sobre a fertilidade, desenvolvimento do gameta e a função mitocondrial. Como resultado, fêmeas selvagens (*Rad51^{fl/fl}*) e nocautes (*Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}*) produziram, respectivamente, 8,8, 7,8 e ~2,8 filhotes/ninhada. Ademais, neonatos provenientes de oócitos *Rad51^{-/-}* apresentaram taxa de mortalidade de ~30%; porém, os filhotes que sobreviveram após o desmame foram caracterizados como viáveis. Não foi observado efeito do nocaute sobre o crescimento oocitário, a morfologia do complexo-cumulus oócito e o número de oócitos ovulados com o primeiro corpúsculo polar. Também não foi observado efeito do nocaute sobre a função mitocondrial com base na análise dos níveis de NAD(P)H, FAD, potencial de membrana mitocondrial e ATP. Porém, oócitos *Rad51^{-/-}* apresentaram maior nível de espécies reativas de oxigênio. Portanto, podemos concluir que a RAD51 não é essencial para o desenvolvimento do oócito e função mitocondrial, porém a sua deficiência resulta em subfertilidade.

Palavras-chave: RAD51, oócito, subfertilidade, mitocôndria.

AUGUSTO, J. D. N. Oocyte-specific deletion of *Rad51* in mice and its impact on mitochondrial function and fertility. 2020. 57 p. Master thesis (Master in Evolutionary Genetics and Molecular Biology) – Federal University of São Carlos, São Carlos.

ABSTRACT

One of the first signs of aging in humans is the decrease in female fertility, which is accompanied by a reduction in the expression of proteins that integrate the Double Strand Break (DSB) repair machinery, such as BRCA1, ATM, MRE11 and RAD51. Therefore, the deficiency of such proteins may result in oocytes of poor quality, with early separation of sister chromatids, aneuploidy, chromosomal breaks as well as increased apoptosis susceptibility. Hence, the present work aimed at inducing oocyte-specific deletion of *Rad51* in mice and assess its effects upon fertility, gamete development and mitochondria function. As a result, wild-type (*Rad51^{fl/fl}*) and knockout (*Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}*) females delivered, respectively 8.8, 7.8 and 2.8 pups/litter. Moreover, pups born to *Rad51^{-/-}* oocytes showed a ~30% mortality rate; however the pups that survived until weaning were considered viable. It was not observed an effect of knockouts on oocyte growth, cumulus-oocyte complex morphology, and the number of ovulated oocytes with first polar body. Likewise, *Rad51* knockout did not impact on mitochondrial function as judged by assessing the levels of NAD(P)H, FAD, mitochondrial membrane potential and ATP. However, *Rad51^{-/-}* oocytes presented a larger level of reactive oxygen species. Therefore, we conclude that RAD51 is not essential for oocyte development and mitochondrial function, however its deficiency results in subfertility.

Keywords: RAD51, oocyte, subfertility, mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-TLD- Ataxia telangiectasia

ATP- Adenosina Trifosfato

BER- Reparo por excisão de bases (do inglês *base excision repair*)

BSA- Albumina sérica bovina

cKO- Nocaute condicional (do inglês *conditional knockout*)

COC- (Complexo Cumulus Oócitos)

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DSB- Quebras de fita dupla no DNA (do inglês *Double Strand Breaks*)

eCG- Gonadotrofina coriônica equina

FAD- Flavinaa adenina dinucleotídeo

FSH- Hormônio folículo estimulante

GV- Vesícula germinativa

hCG- Gonadotrofina coriônica humana

HR- Recombinação homóloga (do inglês *homologous recombination*)

Kb- Quilobase

LH- Hormônio luteinizante

mRNA- RNA mensageiro

mtDNA- DNA mitocondrial

NAD(P)H- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)

NHEJ- Ligação de extremidades não homólogas (do inglês *non homologous end joining*)

Pb- Pares de bases

PB1- Primeiro corpúsculo polar

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

PCR- Reação de polimerase em cadeia

PGC- Célula germinativa primordial

PK- Proteinase K

RNA- Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

ROS- Espécies reativas de oxigênio

rRNA- RNA ribossomal

ssDNA- Dna de fita simples (do inglês *single strand DNA*)

TBE-(tampão Tris/Borato/EDTA)

tRNA- RNA transportador

TZP- Projeção citoplasmática transzonal

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocndrial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada da oogênese e foliculogênese.....	6
Figura 2. O mecanismo de reparo de DSBs por NHEJ ocorre em três estágios: detecção e amarração, processamento, ligação	8
Figura 3. Mecanismo de reparo de quebra de fita dupla por recombinação homóloga	10
Figura 4. O nocaute condicional acontece no início do crescimento oocitário	20
Figura 5. Representação esquemática de cruzamentos I	21
Figura 6. Representação esquemática de cruzamentos II	22
Figura 7. Etapas de genotipagem	25
Figura 8. Obtenção de COCs ovulados	26
Figura 9. Avaliação da quantidade de oócitos que extruíram PB1	27
Figura 10. Teste de Fertilidade	30
Figura 11. Número de filhotes acumulados mensalmente.....	31
Figura 12. Mortalidade de Filhotes oriundos de oócitos <i>Rad51</i> ^{-/-} antes do desmame ..	32
Figura 13. Neonatos provenientes de oócitos <i>Rad51</i> ^{-/-} que chegaram a óbito.....	33
Figura 14. Ganho de peso total.....	33
Figura 15. Ovários dissecados	34
Figura 16. Peso de ovários.....	34
Figura 17. COCs e oócitos desnudos (GV)	35
Figura 18. Diâmetro de oócitos imaturos (GV).....	36
Figura 19. Oócitos ovulados.....	36
Figura 20. Quantidade de oócitos ovulados e extrusão de PB1.....	37
Figura 21. Imagens de autofluorescência de oócitos imaturos e quantificação de FAD e NAD(P)H.....	38
Figura 22. Imagens de fluorescência <i>JCI</i> de oócitos imaturos e quantificação do potencial de membrana	39
Figura 23. Níveis de ATP em oócitos imaturos <i>Rad51</i> ^{fl/fl} e <i>Rad51</i> ^{-/-}	40
Figura 24. Conteúdo de ROS em oócitos imaturos <i>Rad51</i> ^{fl/fl} e <i>Rad51</i> ^{-/-}	41
Figura 25. Conteúdo de ROS em oócitos imaturos <i>Rad51</i> ^{fl/fl} e <i>Rad51</i> ^{-/-} após tratamento com H ₂ O ₂	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura e genótipo de fêmeas que foram utilizadas nos experimentos	22
Tabela 2. Conjunto de primers	24
Tabela 3. Ciclos de PCR.....	25
Tabela 4. Avaliação da fertilidade de fêmeas <i>Rad51^{fl/fl}</i> , <i>Rad51^{+/-}</i> , <i>Rad51^{-/-}</i>	31

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
Oogênese e Foliculogênese.....	4
Reparo de DSBs.....	7
Mitocôndria.....	11
Fertilidade e DSBs em oócitos.....	13
HIPÓTESE.....	15
OBJETIVOS	17
PLANO DE TRABALHO	19
METODOLOGIA.....	23
Manutenção dos animais.....	24
Genotipagem.....	24
Teste de fertilidade.....	25
Ganho de peso.....	26
Coleta de oócitos imaturos.....	26
Coleta de oócitos ovulado.....	26
NAD(P)H e FAD	27
Microscopia confocal.....	27
Análise de ATP.....	28
Análise estatística	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

É notável que mulheres têm postergado cada vez mais a maternidade e, como consequência, enfrentam grande dificuldade em terem filhos. Isso é explicado pela menor fertilidade da mulher após os 35-40 anos de idade, o que está associado ao envelhecimento ovariano e danos oocitários (SUNKARA *et al.*, 2012). Como consequência, além do impacto sobre a fertilidade, mulheres mais velhas apresentam maior risco de produzirem recém-nascidos com anormalidades cromossômicas (PAN *et al.*, 2008).

O envelhecimento ovariano é um processo contínuo que se inicia ao nascimento e se estende até a menopausa, por volta dos 50 anos de idade. O mecanismo principal do envelhecimento é o esgotamento folicular que ocorre de forma progressiva e contínua (SUNKARA *et al.*, 2012; VAN NOORD-ZAADSTRA *et al.*, 1991). No entanto, o envelhecimento do gameta também está associado a menor capacidade de reparo de quebras de fita dupla no DNA (*Double Strand Breaks - DSBs*). Com o envelhecimento, há um declínio progressivo da expressão de proteínas que integram a maquinaria de reparo de *DSBs* nos gametas, entre elas BRCA1, ATM, MRE11 e RAD51. Isso resulta no acúmulo de *DSBs*, as quais podem desencadear ativação da via apoptótica e eliminação acelerada de oócitos. Sabe-se que os oócitos que sobrevivem a esta eliminação acelerada podem apresentar acúmulo excessivo de danos no DNA e serem menos viáveis (TITUS *et al.*, 2013).

Tanto o DNA nuclear como o mitocondrial (mtDNA) estão sujeitos a *DSBs*. Em especial, o mtDNA é bastante propenso a danos oxidativos, pois a mitocôndria é o principal sítio de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula (SHOKOLENKO *et al.*, 2009). Essa situação é ainda agravada com o envelhecimento, uma vez que o acúmulo de *DSBs* no mtDNA resulta em disfunção da organela, maior geração de ROS e posteriormente novos danos ao mtDNA (LENAZ, 1998). Para combater a ocorrência de *DSBs*, a mitocôndria compartilha com o núcleo muitas das proteínas envolvidas na maquinaria de reparo de DNA como, RAD51, RAD51c, XRCC3 e MRE11 (SAGE *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2018; DMITRIEVA *et al.*, 2011; BENNETT & KNIGHT, 2005). Além disso, é sabido que a RAD51 e MRE11 se localizam na matriz mitocondrial, onde se associam fisicamente com o mtDNA (SAGE *et al.*, 2010; SAGE & KNIGHT, 2013; DMITRIEVA *et al.*, 2011).

Em modelos com células cultivadas, a deficiência de RAD51 resultou em depleção de mtDNA, sugerindo um importante papel desta na replicação do genoma mitocondrial (SAGE e KNIGHT, 2013). Ademais, a interferência sobre a expressão de RAD51 durante a maturação de oócitos de camundongos resultou em severo dano sobre a função

mitocondrial (KIM *et al.*, 2016). No entanto, é difícil separar neste último modelo os efeitos mitocondriais e nucleares uma vez que a deficiência de RAD51 no oócito impactou significativamente a progressão da divisão meiótica. Neste contexto, nosso objetivo com o presente trabalho foi investigar a deficiência de RAD51 principalmente durante a fase de crescimento do oócito, quando os efeitos desta recombinação no núcleo não parecem tão evidentes (KUZNETSOV *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2019). É importante destacar que durante o crescimento do oócito o mtDNA é intensamente replicado, (CREE *et al.*, 2008; WAI *et al.*, 2008; WALLACE & CHALKIA, 2013), portanto, esta fase do desenvolvimento parece bastante adequada para se determinar o impacto da deficiência de RAD51 sobre a função mitocondrial e fertilidade.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Oogênese e foliculogênese

Em mamíferos a formação de oócitos (oogênese) tem início durante o desenvolvimento embrionário (BAKER, 1963; GONDOS *et al.*, 1986) com a migração das células germinativas primordiais (PGCs) para as cristas genitais. Subsequentemente ocorre a diferenciação das PGCs em oogônias e a proliferação destas por mitose. As oogônias dão início a meiose e geram milhões de oócitos primários. No entanto, a divisão meiótica é interrompida logo após o seu início no estágio de diplóteno da prófase meiótica I, estágio equivalente a G2/M em células somáticas (PICTON *et al.*, 1998; KRYSKO *et al.*, 2008). Ao nascimento todos os oócitos encontram-se com a divisão meiótica bloqueada em prófase I e assim permanecem até a puberdade quando as ondas de desenvolvimento folicular se iniciam. Portanto, a reserva ovariana é determinada ainda durante a vida fetal (PICTON *et al.*, 1998; PELOSI *et al.*, 2015; JOHNSON *et al.*, 2004).

A foliculogênese se inicia com o recrutamento de células somáticas, denominadas pré-granulosa, que circundam o oócito primário com o propósito de formar o folículo primordial no ovário fetal (CHOI & RAJKOVIC, 2006; CLARKE, 2018). O estímulo para a progressão da foliculogênese e a passagem para o estágio de folículo primário é marcado pela diferenciação das células da pré-granulosa em granulosa, as quais caracterizam-se pelo formato cuboide (BINELLI & MURPHY, 2010; ZHANG & LIU, 2015). O folículo secundário é caracterizado pelo contínuo crescimento do oócito, intensa atividade transcricional e traducional, acúmulo de reservas energéticas, remodelamento mitocondrial e proliferação das células da granulosa que formam uma segunda camada ao redor do gameta. Entre os estágios de folículo primário e secundário também se dá o acúmulo de glicoproteínas que formam ao redor do oócito, a zona pelúcida (FAIR, 2003; FAIR *et al.*, 1997; HYTTEL *et al.*, 1997).

No estágio seguinte da foliculogênese, as células da granulosa formam múltiplas camadas ao redor do oócito. Além disso, verifica-se a formação de uma cavidade antral cheia de fluido (derivado do plasma sanguíneo), o que caracteriza o estágio de folículo antral (BINELLI & MURPHY, 2010; CLARKE, 2018). O fluido folicular separa a granulosa em duas camadas: as células murais da granulosa que se depositam na parte mais externa do folículo; e as células da granulosa do cumulus, que rodeiam o oócito, mantendo contato direto com este através de projeções citoplasmáticas transzonais (TZPs).

Ao conjunto oócito e células do cumulus circundantes dá-se o nome de COC (complexo cumulus-oócito). As células do cumulus transferem nutrientes e sinais essenciais para o oócito através das junções do tipo gap que ligam os dois tipos celulares (KIDDER & VANDERHYDEN, 2010); estas junções são canais intercelulares compostos por proteínas transmembranares denominadas conexinas que permitem a troca de moléculas (KOVAL *et al.*, 2014). Assim o cumulus complementa as necessidades metabólicas do gameta fornecendo piruvato, aminoácidos, colesterol e ATP, sendo estes metabólitos essenciais para o desenvolvimento do oócito (COLLADO-FERNANDEZ *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2009). Por exemplo, os oócitos são incapazes de utilizar eficientemente a glicose como fonte de energia (SU *et al.*, 2009) visto que várias enzimas-chave da via glicolítica são expressas em baixos níveis no gameta. Por outro lado, essas enzimas estão presentes em maior concentração nas células do cumulus. Assim, as células do cumulus são responsáveis por metabolizar glicose a piruvato, o qual é utilizado pelo oócito como substrato energético. Da mesma forma, os oócitos são incapazes de absorver eficientemente certos aminoácidos, os quais são transferidos das células do cumulus para o oócito por meio de junções do tipo gap. As células da granulosa também fornecem colesterol aos oócitos, pois estes são deficientes na expressão de enzimas da via biossintética do colesterol (SUGIURA *et al.*, 2005; EPPIG *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2008).

Ainda durante a fase antral, observa-se a proliferação das células da teca que circundam o folículo por fora da lâmina basal. Estas células dão suporte para a vascularização do folículo e o controle endócrino mediado principalmente pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Com isso, o crescimento folicular nesta fase é dependente dos níveis de FSH, o qual é secretado pela pituitária e se difunde até o folículo onde estimula a proliferação das células da granulosa (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O FSH também determina a expressão nas células da granulosa do receptor do hormônio luteinizante (LH). No estágio seguinte da foliculogênese, o qual é dependente dos níveis e frequência de liberação de LH, somente os folículos com expressão adequada do receptor de LH serão capazes de continuar o desenvolvimento. Isso acontece porque a liberação de estradiol e inibina a partir do folículo em desenvolvimento inibe gradualmente a secreção de FSH e, conseqüente, resulta em atresia folicular (BINELLI & MURPHY, 2010; CLARKE, 2018).

O aumento da frequência de liberação pulsátil de LH durante a fase folicular do ciclo estral sustenta o crescimento do folículo até o estágio pré-ovulatório. Simultaneamente, a interação do LH com o seu receptor nas células da granulosa mural

promove a liberação de ligantes que ativam receptores de EGF presentes também nas células da granulosa (CONTI *et al.*, 2012; EL-HAYEK *et al.*, 2014). O EGF induz uma série de eventos no folículo que preparam o oócito para a ovulação. Dentre estes eventos, destaca-se a redução dos níveis de cGMP nas células da granulosa e no oócito, o que por sua vez resulta na hidrólise do cAMP necessário para a manutenção do bloqueio meiótico (JAFFE & EGBERT, 2017). Outros eventos que se seguem são coletivamente chamados de maturação oocitária e envolvem alterações nucleares e citoplasmáticas determinantes para a ovulação de um oócito competente para ser fecundado e se desenvolver a termo. Entre os eventos citoplasmáticos, destaca-se a redistribuição de mitocôndrias e o posicionamento em regiões específicas de elevada demanda energética no gameta (SATHANANTHAN *et al.*, 2002). Do ponto de vista nuclear, a maturação caracteriza-se pelo rompimento da membrana nuclear (GV) e progressão da meiose. Um dos dois conjuntos de cromossomos homólogos, os quais foram anteriormente duplicados, é descartado pelo oócito ao término da meiose I numa estrutura denominada corpúsculo polar (PB1). Portanto, o oócito ovulado caracteriza-se pela presença do PB1 e pelo bloqueio em metáfase II; a meiose somente é concluída com a fecundação (THIBAUT *et al.*, 1987; HYTTEL *et al.*, 1997), (Figura 1).

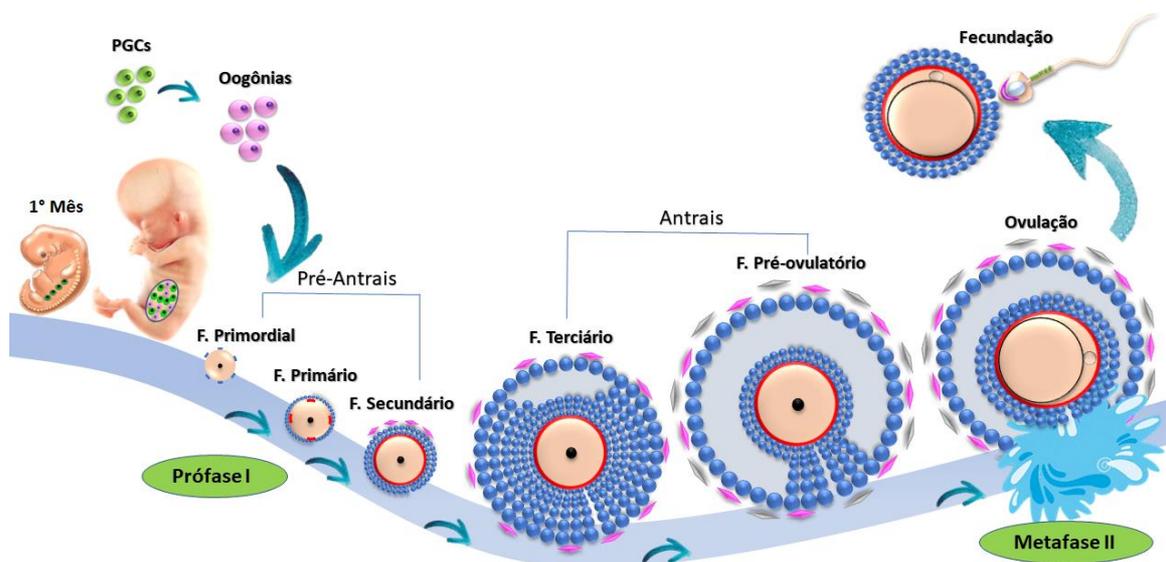


Figura 1. Representação simplificada da oogênese e foliculogênese. As células germinativas primordiais (PGCs) humanas são especificadas por volta da 2^a-3^a semana após a fecundação. No final do primeiro mês de gestação as PGCs migram do saco vitelínico para as gônadas em formação. Neste momento, observamos a diferenciação das PGCs em oogônias e posteriormente em oócitos primários (prófase I). Estes oócitos se associam a células somáticas achatadas (pré-granulosa), formando os folículos primordiais. Os folículos primordiais irão compor a reserva folicular ovariana, e só serão ativados com a chegada da puberdade. Com a foliculogênese, grupos de folículos primordiais são recrutados e dão continuidade ao crescimento oocitário, que ao atingir a fase de folículo pré-ovulatório retomam a meiose I, com conseqüente rompimento da vesícula germinativa, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário. Inicia-se assim a segunda divisão meiótica, que evolui até a metáfase II, marcando o processo de ovulação. A meiose II somente é concluída com a fecundação. Fonte: Autor.

Reparo de DSBs

Estima-se que um milhão de lesões de DNA ocorrem em uma única célula humana todos os dias. Entre os agentes que causam essas lesões incluem-se subprodutos do metabolismo oxidativo como ROS e agentes externos, como radiação ionizante e quimioterápicos. Essas lesões podem ocorrer na forma de quebras de uma ou de ambas as fitas da molécula de DNA. As DSBs são altamente nocivas, podendo resultar em mutagênese, carcinogênese, senescência celular e apoptose. Portanto, uma variedade de mecanismos de reparo de DNA foram desenvolvidos durante a evolução (JACKSON & BARTEK, 2009). As DSBs podem ser reparadas com base na sequência do cromossomo homólogo. Este reparo por homologia é chamado de recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR), sendo mais comum em células meióticas. Em células mitóticas, DSBs são preferencialmente reparadas pelo mecanismo de junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ), o qual não preserva a sequência original da molécula de DNA. Em oócitos, portanto, o mecanismo de HR é o mais comumente utilizado para o reparo de DSBs. Além disso, a maquinaria de HR é essencial durante a divisão meiótica para a ocorrência do *crossing-over* e contribui com a geração de variabilidade genética. A HR também é determinante para o correto pareamento e segregação dos cromossomos, assegurando a manutenção da ploidia celular ao término da meiose (FEATHERSTONE & JACKSON, 1999; PÂQUES & HABER, 1999).

Várias proteínas interagem e compõem a maquinaria de reparo de DSBs por NHEJ e HR. As principais proteínas necessárias no reparo por NHEJ são os heterodímeros Ku70/Ku80, a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), DNA ligase IV, XRCC4 e o fator do tipo XLF. O reparo por NHEJ ocorre em três estágios, sendo o primeiro caracterizado pela detecção da DSB pelo heterodímero Ku, com subsequente ligação a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) para formar o complexo DNA-PKcs-Ku-DNA. O segundo passo envolve o processamento enzimático das extremidades do DNA, por exemplo, remoção de grupos terminais não ligáveis (fosfatos, fosfoglicolatos) por PNKP. Na etapa final as extremidades do DNA são religadas por Ligase IV, que funciona em complexo com XRCC4 e XLF (WANG *et al.*, 2013; MAHANEY B. *et al.*, 2009; RASSOOL, 2003), (Figura 2).

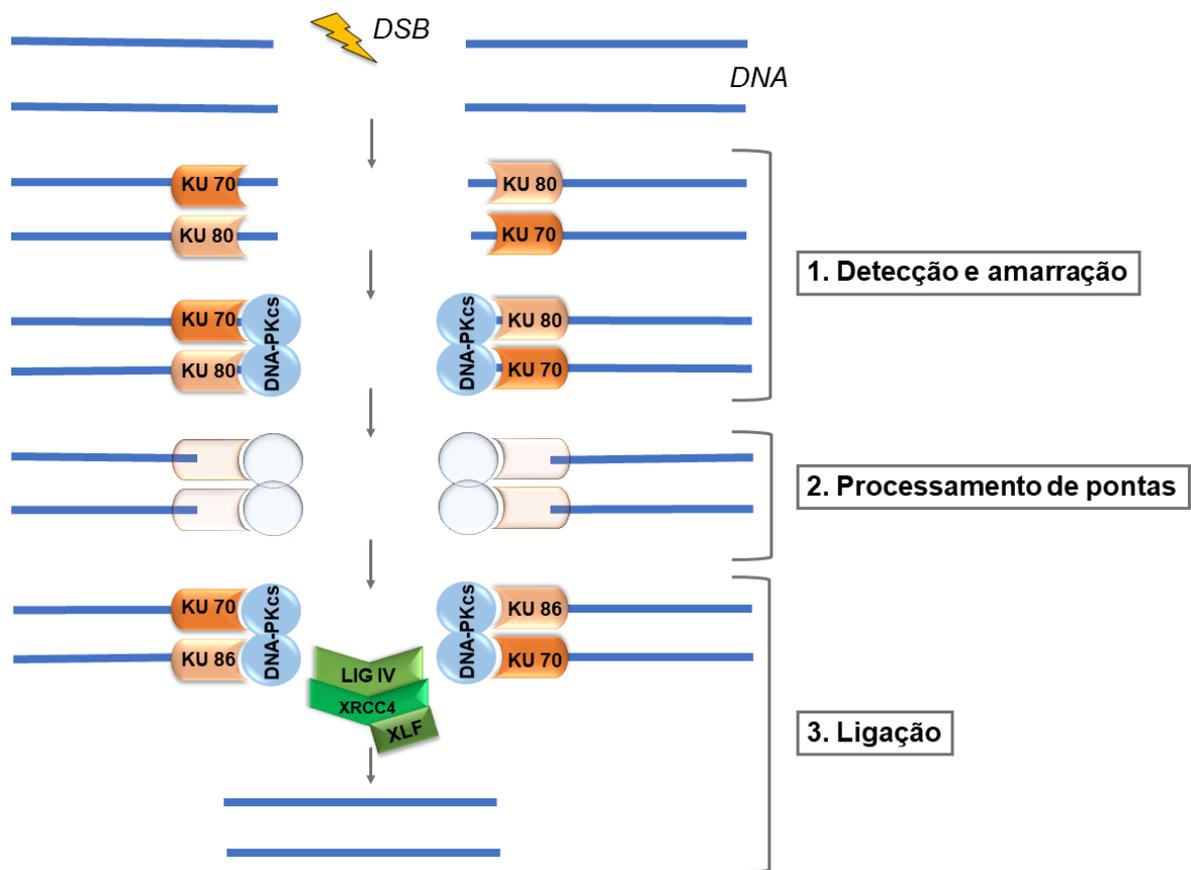


Figura 2. O mecanismo de reparo de DSBs por NHEJ ocorre em três estágios: detecção e amarração, processamento, ligação do DNA. Juntas, essas interações proteína-proteína estabilizam o complexo dinâmico de NHEJ em DSBs. Na etapa de detecção da DSB observa-se a formação do complexo DNA-PKcs-Ku-DNA. O processamento final inclui não apenas a remoção nucleolítica de seções dos terminais de DNA, mas também o preenchimento de lacunas por polimerases. Espera-se que o processamento de pontas de DSB leve à perda ou modificação de nucleotídeos de ambos os lados da quebra, tornando o NHEJ propenso a erros (mutação por deleção). o último passo é marcado pela ligadura das extremidades do DNA, realizada pelo complexo ligase IV- XRCC4-XLF. Fonte: Autor.

Embora a NHEJ seja o principal modo de reparo de DSBs em células somáticas na fase de G0-G1 do ciclo celular, a HR desempenha papel predominante nessas células durante a fase de S-G2/M. Uma vez que o bloqueio da meiose em oócitos (em diploteno) equivale a fase de G2/M, é plausível que a HR seja a principal via responsável pelo reparo de danos ao DNA em oócitos. Ademais, a disponibilidade de cromátides irmãs e homólogos favorece o reparo por homologia, minimizando a introdução de mutações em comparação com a via NHEJ (KUJJO *et al.*, 2010).

Várias proteínas estão envolvidas no reparo por HR, incluindo, MRE11/Rad50/NBS1 (MRN), MDC1, 53BP1 e BRCA1 (SHILOH, 2006). O complexo proteico MRN funciona como um sensor para DSBs e possui atividade de ligação, desenrolamento e amarração da molécula de DNA, além de atuar como endonuclease. A atividade endonucleolítica da MRN é reforçada pela CtIP, sendo responsável pelo processamento das extremidades 5'-3' do DNA (resseção nucleotídica) com o intuito de

produzir uma fita simples de DNA (single strand DNA - ssDNA) com extremidade 3'OH livre. O complexo MRN, através da subunidade NBS1 também é essencial para a ativação eficiente da cinase ATM (JAZAYERI *et al.*, 2008; SHILOH, 2006; YOU *et al.*, 2005). A MDC1 também tem sido relacionada a ativação de ATM; o recrutamento do dímero MDC1-ATM para o local da DSB possibilita que, ATM fosforile histonas γ H2AX, com consequente estabilização de ligação MDC1-ATM ao local da DSB e ativação das vias a jusante que levam à parada do ciclo celular via CHK2 e inibição do CDC2 (no ponto de verificação G2/M). A fosforilação das histonas γ H2AX por ATM, funciona como uma âncora para a ligação de moléculas adicionais de MDC1. Esse processo cíclico parece ser a força motriz subjacente ao acúmulo de γ H2AX fosforilada sobre as DSBs, o que viabiliza a formação de uma plataforma para o recrutamento de proteínas adicionais como, 53BP1 (sensor de alterações na estrutura da cromatina) e BRCA1 (auxilia na retenção do complexo MRN) (STUCKI *et al.*, 2005; LOU *et al.*, 2006; TURAN & OKTAY, 2020).

Ainda durante a HR, a extremidade 3'OH do ssDNA se liga a proteína de replicação A (RPA) (SAN FILIPPO *et al.*, 2008; KROGH & SYMINGTON, 2004); esta ligação tem a função de impedir a formação de estruturas em grampo bem como a degradação nucleotídica. A seguir, por ação de mediadores como BRCA2 e RAD52, RPA é substituída por RAD51, formando o fragmento pré-sináptico (SAN FILIPPO *et al.*, 2008; KREJCI *et al.*, 2012; KASS & JASIN, 2010).

Após a formação do filamento nucleoproteico, RAD51 interage com a RAD54 com o objetivo de catalisar a invasão do duplex de DNA e encontrar uma região de homologia no cromossomo homólogo (HEYER *et al.*, 2006). No estágio pós-sináptico, RAD54 parece catalisar a remoção de RAD51 para viabilizar o acesso de DNA polimerases a extremidade 3'OH. Acredita-se que a RAD54 tem capacidade de remover RAD51 fornecendo às DNA polimerases acesso a extremidade-3'OH para início da síntese de DNA. O modelo de reparo de DSBs por HR prevê que a outra extremidade da quebra seja capturada pela cadeia deslocada do duplex doador (D-loop) e utilizada para iniciar uma segunda síntese de DNA com consequente formação de junções *Holliday*; a resolução destes por endonucleases específicas resulta nos produtos da HR (HEYER *et al.*, 2006; SAN FILIPPO *et al.*, 2008), (Figura 3).

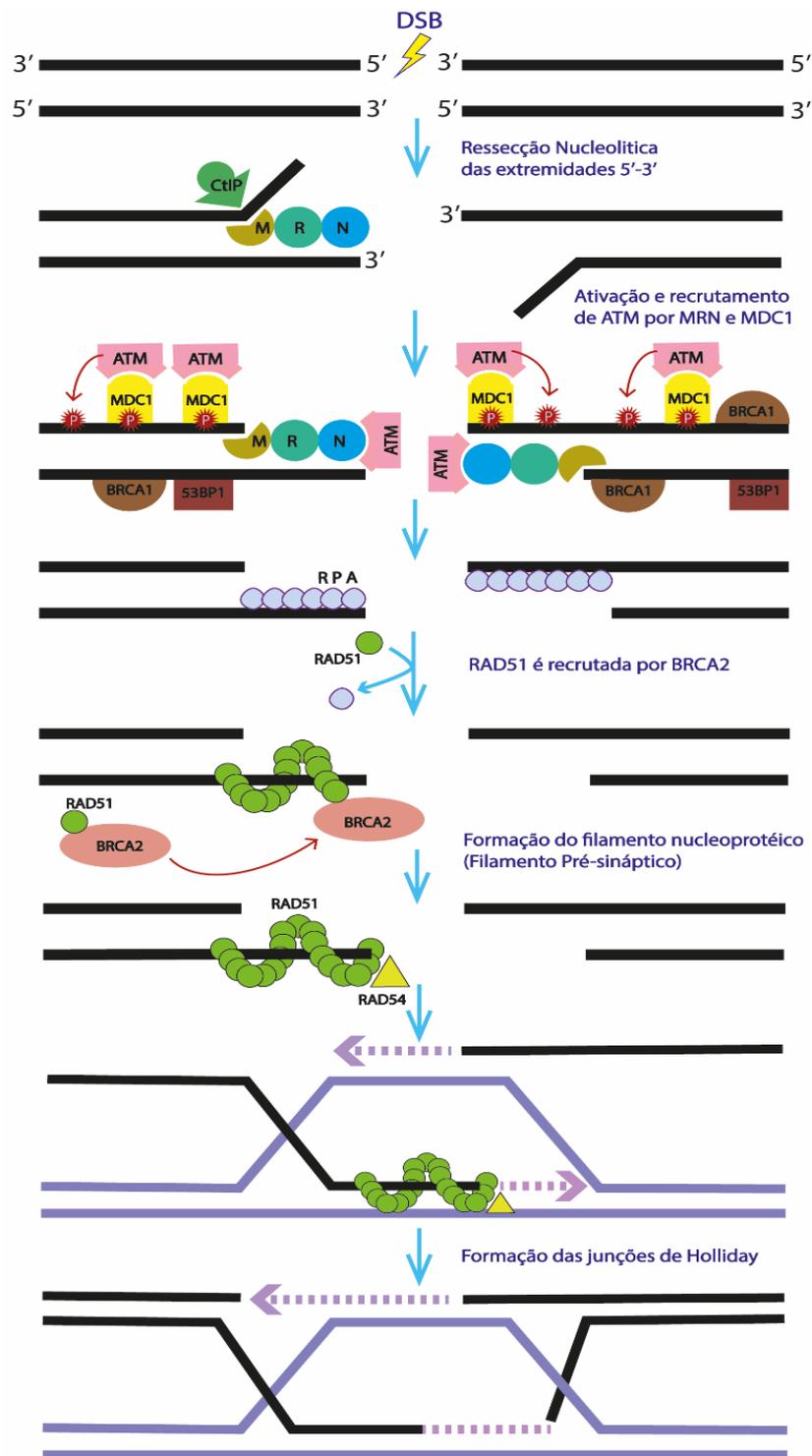


Figura 3. Mecanismo de reparo de quebra de fita dupla por recombinação homologa. Após a quebra de dupla fita de DNA (DSB), o complexo proteico MRN é recrutado para o local danificado, sendo responsável pelo processamento das extremidades 5'-3' juntamente com a proteína CtIP. MRN também é capaz de interagir e ativar ATM, enquanto MDC1 recruta ATM (MDC1-ATM em forma de dímeros) para os locais de DSBs; ATM também é capaz de fosforilar as histonas γ H2AX, as quais funcionam como ponto de ancoragem para ligação de moléculas adicionais de MDC, além de BRCA1, 53BP1, etc. RPA se liga a extremidade 3'-OH da fita simples de DNA (ssDNA). BRCA2 interage com RAD51 e direciona-a para os locais de quebra; assim RAD51 é capaz de se ligar ao ssDNA formando um fragmento pré-sináptico (nucleoproteico). RAD51 interage com RAD54 catalisando a invasão do duplex de DNA e a busca por região de homologia no cromossomo homólogo. Fonte: Autor.

A importância da via de reparo por HR é demonstrada por mutações em genes que participam desta via, as quais estão intrinsecamente associadas a síndromes severas e letalidade devido ao acúmulo de DSBs e aberrações cromossômicas (LI & HEYER, 2008). Por exemplo, mutações no gene codificador da ATM foram associadas a síndrome Ataxia Telangiectasia (A-TLD), a qual causa uma desordem neurodegenerativa caracterizada por pronunciada degeneração cerebelar, além de predisposição ao câncer. Pacientes com A-TLD apresentam sintomas adicionais de imunodeficiência, retardo de crescimento, envelhecimento prematuro e resistência a insulina (AMBROSE & GATTI, 2013). Mutações hipomórficas no gene *NBS1* em humanos resultam na síndrome de ruptura de Nijmegen, um raro distúrbio caracterizado por microcefalia, imunodeficiência e predisposição ao câncer (CARNEY *et al.*, 1998). Mutações no gene *MRE11* em humanos levam a um distúrbio semelhante a A-TLD no qual os pacientes exibem ataxia e neurodegeneração (STEWART *et al.*, 1999). As linhas celulares derivadas de pacientes com mutações em *NBS* e *ATM* têm sido valiosas para dissecar as funções do MRN e as consequências da função que estão comprometidas. Células contendo mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão relacionadas a malignidade celular e susceptibilidade a vários cânceres, principalmente câncer de mama e de ovário (MOYNAHAN, 2002). Por outro lado, em murinos, o nocaute de genes que atuam na via de HR normalmente resultam em letalidade embrionária. Isso impede o estudo profundo da maquinaria de HR, como verificado para componentes do complexo MRN (LAMARCHE *et al.*, 2010) e para a RAD51 (TSUZUKI *et al.*, 1996; LIM & HASTY, 1996). Uma alternativa a uso de modelos nocautes tem sido o emprego de animais condicionais nocaute no qual a deficiência do gene de interesse está restrita a um tecido ou momento específico.

Mitocôndria

As mitocôndrias são remanescentes da simbiose entre uma α -proteobactéria e uma precursora da célula eucariótica, evento este que deve ter ocorrido há cerca de dois bilhões de anos (LANE & MARTIN, 2012). Como parte do processo adaptativo durante a evolução, grande parte do material genômico da α -proteobactéria foi transferido para o genoma nuclear. O que resta nas mitocôndrias da maioria dos mamíferos, incluindo humanos e murinos, é um genoma circular pequeno, de 16 kilobases (Kb), o qual está presente em múltiplas cópias dentro de cada organela (GABALDÓN & HUYNEN, 2004). O genoma mitocondrial (mtDNA) de mamíferos abriga informações para codificação de 13 RNAs mensageiros (mRNAs) que são traduzidos na matriz mitocondrial com auxílio de 22

RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossomais (rRNAs) também codificados pelo mtDNA. Os 13 poli-peptídeos resultantes compõem, juntamente com outros poli-peptídeos codificados pelo DNA nuclear, parte dos complexos I, III, IV e V da cadeia transportadora de elétrons; somente o complexo II é codificado exclusivamente por genes localizados no núcleo. Portanto, esses poli-peptídeos localizam-se na membrana mitocondrial interna e são essenciais para a geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa (FUNG *et al.*, 2013; MITCHELL, 1961). Todas as demais proteínas mitocondriais, as quais são representadas por cerca de 1500 proteínas envolvidas nas várias funções mitocondriais (componentes de membrana, ciclo de Krebs, entre outros), são codificadas no núcleo, traduzidas no citoplasma e importadas pela mitocôndria (CHINNERY *et al.*, 2000).

A produção de ATP na mitocôndria está atrelada a oxidação de substratos energéticos, os quais são principalmente extraídos via ciclo de Krebs. Elétrons provenientes da oxidação dos substratos energéticos são levados até a cadeia transportadora de elétrons por aceptores como NADH e FADH₂, sendo posteriormente transferidos, respectivamente, aos complexos I e II. Na etapa seguinte, os elétrons são carreados dos complexos I ou II até o IV, onde são finalmente utilizados para redução do O₂ a H₂O. O carreamento de elétrons pelos complexos da cadeia transportadora também tem a finalidade de extrair energia utilizada para o bombeamento de prótons H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Como resultado do acúmulo de H⁺ há a formação de um potencial de membrana na mitocôndria ($\Delta\Psi_m$). Posteriormente, o retorno dos H⁺ para a matriz mitocondrial regulado pelo complexo V, é utilizado como força motriz para a produção de ATP (MITCHELL, 1961; FRIEDMAN & NUNNARI, 2014).

Sabe-se que o mtDNA está localizado na matriz mitocondrial, possivelmente ligado à membrana mitocondrial e próximo aos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Como consequência, isso o torna suscetível a danos oxidativos visto que a redução incompleta do O₂ pode resultar na formação de ROS como o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (KANG & HAMASAKI, 2012). Ademais, ROS podem danificar outras estruturas da organela por oxidação de proteínas e lipídios mitocondriais, com possível prejuízo sobre a função mitocondrial. Acredita-se que níveis elevados de mutações no mtDNA em relação ao DNA nuclear decorrem da proximidade física do primeiro em relação aos sítios de geração de ROS (WALLACE, 2005). No entanto, esta teoria tem sido questionada visto que transições (as quais estão atreladas a erros replicativos) são muito mais comum no mtDNA do que transversões (as quais originam-se principalmente de danos oxidativos). No entanto, independente da origem, mutações no

mtDNA podem ser bastante deletérias para a função mitocondrial e celular (ITSARA *et al.*, 2014).

A integridade da sequência do mtDNA é mantida por enzimas, em grande parte, compartilhadas com o núcleo. A via de reparo por excisão de bases (BER), por exemplo, é bastante comum em mitocôndrias, sendo que todas as enzimas necessárias para esta via foram identificadas como presentes na matriz mitocondrial (DIANOV *et al.*, 2001; MUFTUOGLU *et al.*, 2014). O reparo por BER consiste em reparar pequenas distorções na estrutura da dupla-hélice, as quais normalmente estão atreladas a desaminação, alquilação ou oxidação de bases (MENCK & MUNFORD, 2014). Por outro lado, não existem fortes evidências em mamíferos de que o mtDNA é reparado por HR. As poucas evidências envolvem a presença de dímeros circulares e catenanos, os quais são indicativos de HR (CLAYTON & VINOGRAD, 1967; POHJOISMÄKI & GOFFART, 2011). Também já foram detectados híbridos paterno e materno de mtDNA em humanos (KRAYTSBERG *et al.*, 2004). É importante destacar que a RAD51 e outras proteínas acessórias relacionadas a HR (*e.g.*, RAD51C, XRCC3, MRE11) já foram descritas como presentes em mitocôndrias humanas (SAGE *et al.*, 2010; DMITRIEVA *et al.*, 2011). Ainda, foi comprovado que a RAD51 interage fisicamente com o mtDNA, dando suporte a manutenção do número de cópias de mtDNA sob condição de estresse replicativo e oxidativo (SAGE *et al.*, 2010) MRE11 também se liga ao mtDNA, e a sua quantidade na matriz mitocondrial varia dependendo do estresse. Isso sugere que MRE11 atue na manutenção da integridade do genoma mitocondrial (DMITRIEVA *et al.*, 2011). Contudo, a presença na mitocôndria das demais proteínas necessárias para a ocorrência de HR ainda carece de comprovação.

Fertilidade e DSBs em oócitos

Nas últimas décadas observou-se uma tendência crescente de mulheres postergarem a gestação para a faixa etária de 35-40 anos (SCHMIDT *et al.*, 2012). Em paralelo, verificou-se um aumento acentuado da incidência de infertilidade, aborto espontâneo e defeitos congênitos (HASSOLD & HUNT, 2001; NAGAOKA *et al.*, 2012); associados a erros cromossômicos em mulheres com idade avançada. Sabe-se que a maioria dos erros cromossômicos detectados em gestações humanas resulta de erros meióticos nos oócitos; enquanto que, erros na divisão meiótica em espermatozoides respondem por menos de 5% das aneuploidias fetais (HASSOLD & HUNT, 2001). Para a maioria dos cromossomos de mamíferos a aneuploidia é incompatível com a vida, resultando em infertilidade devido ao bloqueio do desenvolvimento embrionário e falha na implantação.

Algumas trissomias, como as que atingem os cromossomos 13, 18 e 21, são compatíveis com o desenvolvimento a termo, resultando em graves síndromes (NAGAOKA *et al.*, 2012) como a síndrome de Patau (trissomia do cromossomo 13), síndrome de Edward (trissomia do cromossomo 18) e síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21). Destes, a trissomia do cromossomo 21 é a mais comum, tendo a sua incidência aumentada dramaticamente nas últimas décadas (MORRIS & ALBERMAN, 2009; LOANE *et al.*, 2013).

Os danos ao DNA têm significativo impacto sobre os índices reprodutivos. Os oócitos de mamíferos são particularmente vulneráveis a esses danos visto que podem permanecer quiescentes no ovário por décadas até serem estimulados a se desenvolverem. Quebras no DNA nuclear do oócito são essenciais para ocorrência do *crossing-over* e correta segregação cromossômica durante a meiose (CARROLL & MARANGOS, 2013).

Por outro lado, o DNA do oócito também está sujeito a quebras decorrentes de erros replicativos, radiação, quimioterápicos, etc. Um estudo mostrou que fêmeas de murinos envelhecidas são mais propensas ao acúmulo de DSBs nos oócitos, o que foi associado a reduzida expressão dos genes *Mre11*, *Rad51*, *Atm* e *Brc1*. Esses achados sugerem que oócitos envelhecidos são deficientes no reparo por HR. De fato, a superexpressão de *Brc1* em oócitos envelhecidos reduz a incidência de DSBs e aumenta a viabilidade destes (TITUS *et al.*, 2013).

Os poucos estudos já desenvolvidos envolvendo reparo de DNA e o gameta feminino se concentraram em investigar os efeitos a nível nuclear associados a maquinaria de HR. Porém, dada a presença de enzimas como RAD51, RAD51C, XRCC3 e RME11 na mitocôndria, é bastante provável que a deficiência dessas também tenha impacto sobre a função da organela no oócito. Em consonância com essa hipótese, o silenciamento gênico da *Rad51* durante a maturação oocitária em murinos resultou em evidente disfunção mitocondrial, desalinhamento cromossômico e bloqueio da divisão meiótica (KIM *et al.*, 2016). Porém, é difícil isolar esses efeitos mitocondriais de um possível efeito da deficiência de RAD51 sobre a progressão meiótica e a estabilidade do DNA nuclear. Neste contexto, no presente trabalho realizamos o nocaute oócito-específico da *Rad51* desde o estágio de folículo primário-secundário. Fêmeas portadoras desses oócitos foram investigadas quanto a fertilidade e a viabilidade de sua progênie. Também foi investigado no oócito o impacto da deficiência de RAD51 sobre o diâmetro do gameta, a ovulação, a função mitocondrial, o nível de NAD(P)H/FAD e o conteúdo de ATP.

HIPÓTESE

HIPÓTESE

A deleção oócito-específica de *Rad51* em camundongos durante o período de crescimento do oócito resulta em disfunção mitocondrial, baixa qualidade oocitária e infertilidade.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral

- Determinar o impacto da deficiência oócito-específica de RAD51 sobre o desenvolvimento do gameta, a fertilidade e a função mitocondrial em camundongos.

Específicos

- Avaliar a fertilidade de fêmeas selvagens (*Rad51^{fl/fl}*) e com deleção oócito-específica de *Rad51* (*Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}*) por meio do acasalamento com machos selvagens;
- Avaliar o impacto da deficiência de RAD51 sobre a morfologia dos COCs, crescimento dos oócitos e ovulação.
- Avaliar o impacto da deficiência de RAD51 sobre o $\Delta\Psi_m$, e os níveis de, ROS, FAD, NAD(P)H e ATP.

PLANO DE TRABALHO

PLANO DE TRABALHO

Este projeto utilizou como modelo celular o gameta feminino e teve como objetivo caracterizar o papel da *Rad51* na linhagem germinativa feminina e suas implicações para a fertilidade e a função mitocondrial. Para tanto, foi realizado o nocaute condicional da *Rad51* baseado no emprego de duas linhagens de camundongos geneticamente modificados. Uma linhagem apresentava o éxon 4 do gene *Rad51* flanqueado por sequências loxP (*floxed – fl*), enquanto a outra linhagem foi modificada geneticamente para expressar Cre recombinase (CRE) sob o comando do promotor do gene *Zp3* (*Zp3-CRE*) (DE VRIES *et al.*, 2000).

Como resultado do acasalamento dessas duas linhagens foram obtidos animais em que a expressão de CRE exclusivamente no oócito a partir de folículos primários-secundários resultou na recombinação dos sítios loxP e consequente excisão do éxon 4 da *Rad51* (Figura 4).

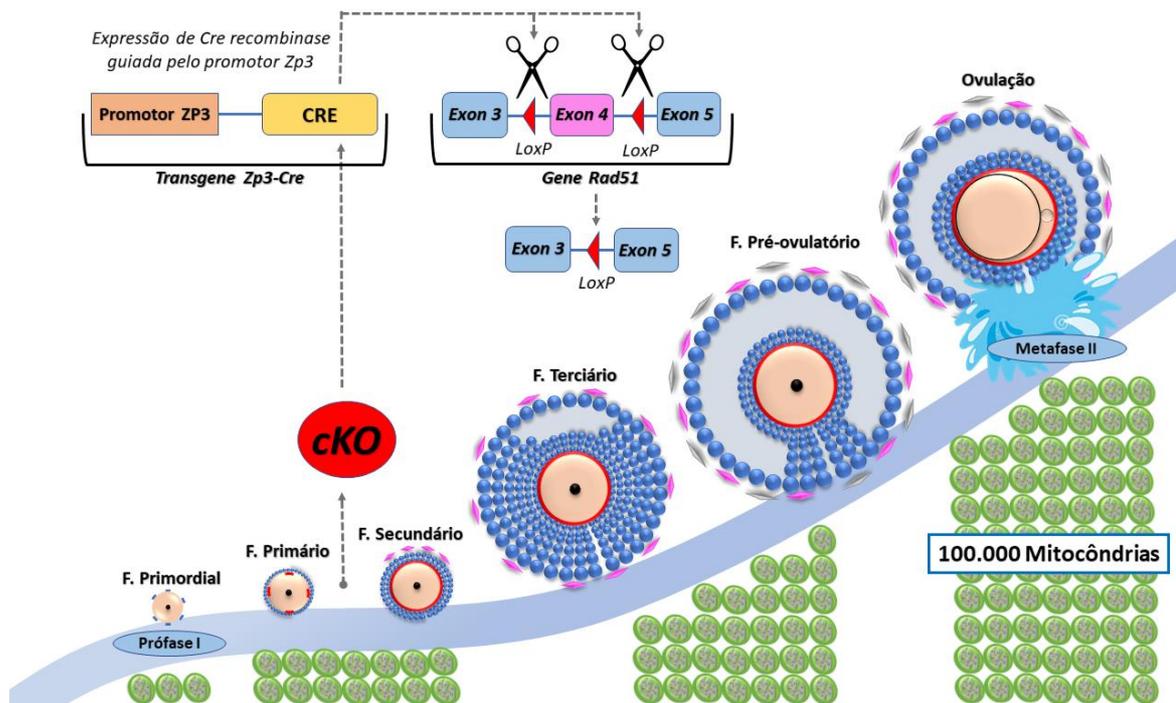


Figura 4. O nocaute condicional do gene *Rad51* acontece no início do crescimento oocitário. A expressão de CRE recombinase é dirigida pelo promotor do gene *Zp3* (*Zp3-CRE*), o qual é exclusivamente expresso em oócitos a partir da transição de folículo primário para secundário. A Cre recombinase reconhece sequências loxP que flaqueiam o éxon 4 do gene *Rad51* e o excisa, tornando o gene inválido para a expressão de RAD51. O nocaute acontece durante um período de intenso crescimento da oogênese, em que as mitocôndrias se multiplicam rapidamente, passando de algumas centenas para cerca de cem mil em oócitos maduros. Do mesmo modo que há um aumento no número de cópias do mtDNA, que atinge ~200.000 moléculas em oócitos completamente crescidos. Fonte: Autor.

A obtenção do modelo animal foi realizada por cruzamento das linhagens citadas acima: machos $Zp3-CRE^{+/-}:Rad51^{fl/+}$ com fêmeas $Rad51^{fl/+}$. Como resultado desse acasalamento, fêmeas com os seguintes genótipos foram utilizadas nos experimentos: controle selvagem (denominado $Rad51^{fl/fl}$) - $Zp3-CRE^{-/-}:Rad51^{fl/fl}$; nocaute em heterozigose (denominado $Rad51^{+/-}$) - $Zp3-CRE^{+/-}:Rad51^{fl/+}$; e, nocaute em homozigose (denominado $Rad51^{-/-}$) - $Zp3-CRE^{+/-}:Rad51^{fl/fl}$. Respectivamente, essas fêmeas produziam oócitos com os seguintes genótipos: $Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$ e $Rad51^{-/-}$ (Figura 5).

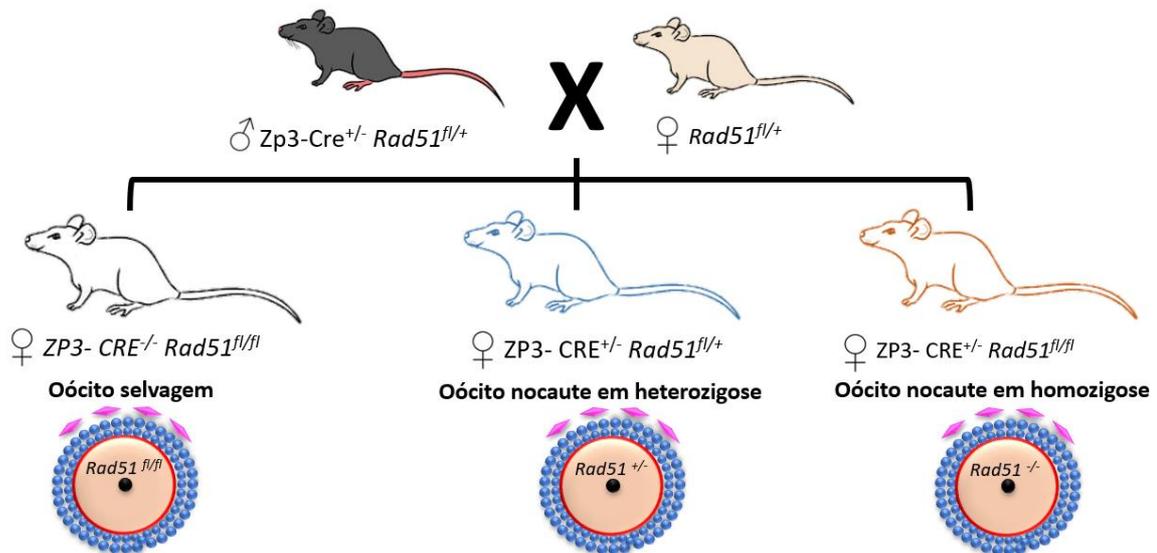


Figura 5. Representação esquemática de cruzamentos para obtenção de filhotes fêmeas com oócitos $Zp3-CRE^{-/-}/Rad51^{loxP/loxP}$ (controle selvagem), $Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{+/-}$ (nocaute em heterozigose) e $Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{-/-}$ (nocaute em homozigose). Fonte: Autor.

Num seguinte momento, visando aumentar a frequência de nascimento de fêmeas $Zp3-CRE^{-/-}/Rad51^{fl/fl}$ e $Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{fl/fl}$, casais com os seguintes genótipos passaram a ser utilizados: machos $Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{fl/fl}$ e fêmeas $Zp3-CRE^{-/-}:Rad51^{fl/fl}$ (Figura 6).

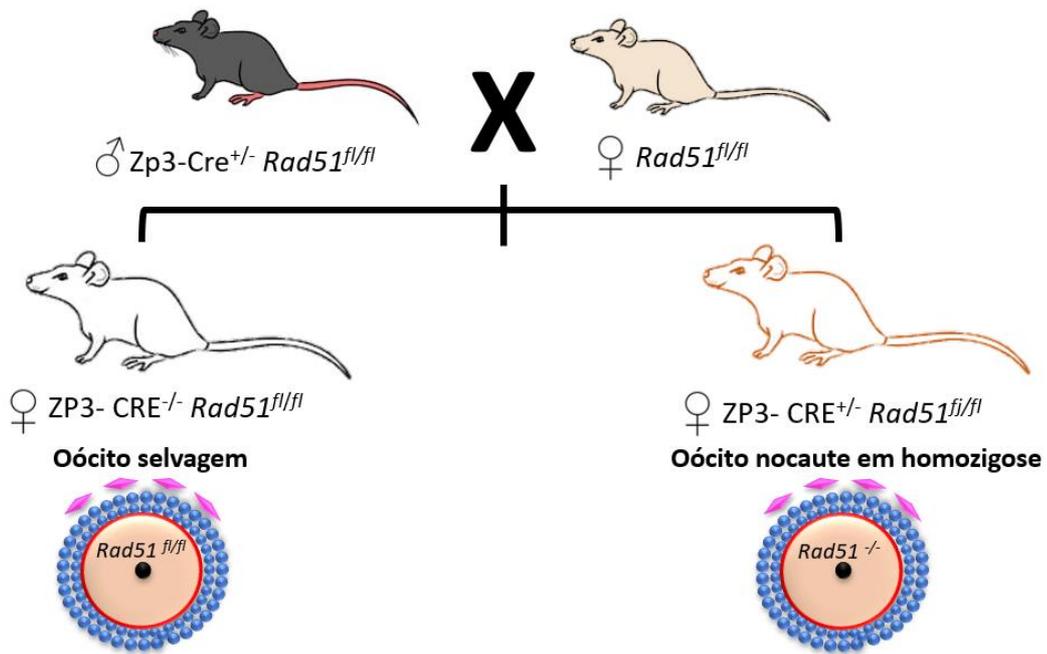


Figura 6. Representação esquemática de cruzamentos para aumentar a quantidade de filhotes fêmeas com óócitos $Rad51^{loxP/loxP}$ (controle selvagem) e $Zp3-Cre^{+/-}/Rad51^{loxP/loxP}$ (nocaute em homocigose). Fonte: Autor.

Para melhor entendimento, os genótipos das fêmeas utilizadas nos experimentos, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela1: Nomenclatura e genótipos			
Grupos	Nomenclatura	Genótipo (tec. somáticos)	Genótipo (oócito)
Controle selvagem	$Rad51^{fl/fl}$	$Zp3-CRE^{-}/Rad51^{fl/fl}$	$Zp3-CRE^{-}/Rad51^{fl/fl}$
Nocaute em heterocigose	$Rad51^{+/-}$	$Zp3-CRE^{+/-};Rad51^{fl/+}$	$Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{+/-}$
Nocaute em homocigose	$Rad51^{-/-}$	$Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{fl/fl}$	$Zp3-CRE^{+/-}/Rad51^{-/-}$

Obs. Nomenclatura e genótipo de fêmeas (tecidos somáticos e oócitos) que foram utilizadas nos experimentos.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

Manutenção dos animais

Os camundongos foram acondicionados a 22°C em um ciclo de 12h de luz e 12h de escuro, e tiveram acesso *ad libitum* a água e ração (*Presence Ratos e Camundongos*, Purina). Para a manutenção dos animais seguiu-se o *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*.

Genotipagem

Para a genotipagem dos animais foi utilizado DNA total isolado de biópsia de orelha, como descrito previamente (MACHADO *et al.*, 2015). As amostras foram colocadas em 200µL de solução de digestão [50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 2mM MgCl₂, 0,1mg/mL gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100µg/mL proteinase K] por 3 horas a 65°C, em seguida incubadas por 20 minutos a 95°C para inativação da proteinase K (PK). Posteriormente, as amostras foram diluídas em água ultrapura (Life Technologies) em uma proporção 1:5 para amplificação dos alelos floxed e selvagem para a *Rad51* e do transgene *Zp3-CRE* (Tabela 2).

Tabela 2: Conjunto de Primers

Gene Alvo	Sequência 5'-3'
<i>Rad51 (forward)</i>	TCCCTTACCCTGCGTTATAAGC
<i>Rad51 (reverse)</i>	GGTGGAGTACAGGACAGAAG
<i>Zp3-CRE (forward)</i>	TTGATAATGGGCTCCACCCG
<i>Zp3-CRE (reverse)</i>	GCGAACCTCATCACTCGTTG
<i>C.I. (forward)</i>	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
<i>C.I. (reverse)</i>	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Obs. Conjunto de primers utilizados para genotipagem de *Rad51* e determinação da presença de *Zp3-CRE*. O primer C.I. (Controle Interno) foi amplificado conjuntamente com o transgene *Zp3-CRE* para confirmar o sucesso da amplificação.

No caso da amplificação da *Rad51*, os seguintes produtos de PCR eram esperados: 510 pb (forma selvagem do gene) e 474 pb (forma floxed do gene). Para a *Zp3-CRE* e o C.I. eram esperados produtos de PCR de 262 pb e 324 pb, respectivamente.

As reações de PCR foram realizadas utilizando 400 µM de cada primer (F e R), 5 µL de amostra lisada e diluída, 10 µL do reagente *JumpStart* (Sigma-Aldrich), segundo as recomendações do fabricante. A ciclagem térmica utilizada para amplificação dos alvos é apresentada na Tabela 3.

	Desnaturação		Hibridização		Extensão	
	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (min, s)	T (°C)	t (min)
Rad51	94°C	30s	60°C	1min	65°C	2min
Zp3-Cre	94°C	30s	60°C	30s	72°C	2min

Obs. Ciclos de PCR utilizados para amplificação da *Rad51*, *Zp3-CRE* e controle interno (C.I.), indicando a temperatura e o tempo utilizado nas fases de desnaturação, hibridização e extensão. O C.I foi amplificado conjuntamente com a *Zp3-CRE*.

Após a amplificação dos alvos, os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2,5% em TBE (tampão Tris/Borato/EDTA) contendo 5 µL de *SYBR Safe* (Life Technologies). Os produtos de PCR foram submetidos a 90 V de tensão por 55 minutos e analisados utilizando o equipamento ChemiDoc™XRS+ (BIO-RAD) (Figura 7).

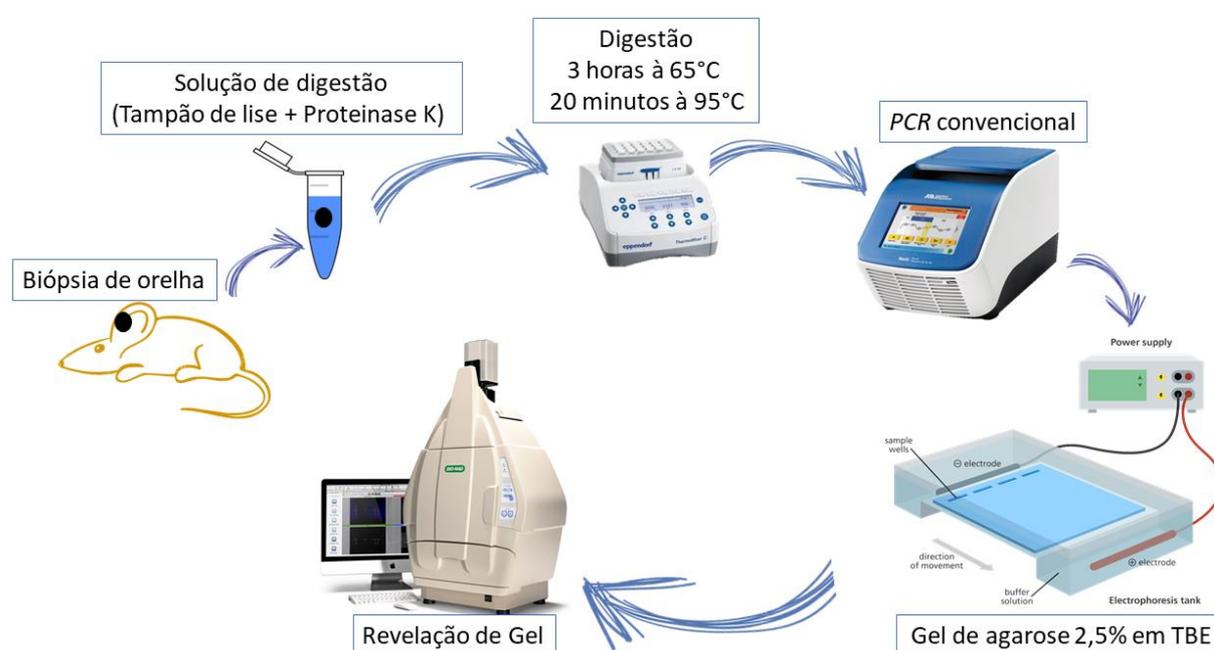


Figura 7. Etapas de genotipagem. Primeiro foi realizada a biópsia de orelha de camundongo, seguido de digestão do material biológico, utilizando tampão de lise mais proteinase K (PK), durante um período de 3 horas a 65°C e inativação de PK por 20 minutos a 95°C. Após finalização da digestão, as amostras foram diluídas e preparadas para a reação de PCR convencional e postas em termociclador para amplificação dos genes alvo. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2,5% em TBE e analisados no equipamento *ChemiDoc™XRS+* (BIO-RAD).

Teste de fertilidade

O teste de fertilidade foi realizado por acasalamento de três machos selvagens com três fêmeas para cada um dos três grupos experimentais de interesse (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}*). Para a realização deste experimento utilizamos animais com 7-8 semanas de idade. Após a montagem das matrizes, realizamos a inspeção semanal quanto a prenhes, número de filhotes nascidos, mortalidade de filhotes e desmame, por um período total de 8 meses.

Ganho de peso

Para a análise de ganho peso, os filhotes oriundos de fêmeas portadoras de oócitos *Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}* foram alocados com no máximo 5 animais por caixa. Os animais

foram pesados na terceira, quarta, quinta, sexta, sétima e oitava semana de vida. Para isso utilizou-se uma balança padrão. Foram analisadas pelo menos duas gerações de filhotes fêmeas de cada matriz. O ganho de peso ao longo desse período (6 semanas após o desmame) foi obtido pela diferença de peso entre a oitava semana em relação a terceira semana de vida.

Coleta de oócitos imaturos

Fêmeas pré-púberes com 21-23 dias de idade foram superovuladas utilizando 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) por injeção via intraperitoneal (NAGY *et al.*, 2003). Após 43-44 horas, foi feita a eutanásia das fêmeas, os ovários foram coletados e dissecados em solução fisiológica, seguido de rompimento dos folículos antrais com agulha 30G para obtenção dos COCs imaturos em meio *MEM-alpha* (ThermoFisher Scientific) tamponado com HEPES (BRIEN *et al.*, 2003). A morfologia dos COCs foi analisada em microscópio invertido sob luz (Ti-S, Nikon). Os COCs foram desnudados das células do cumulus por uso de capilar de vidro (diâmetro interno de 60-100 μm). Os oócitos imaturos (GV) livres de células do cumulus tiveram o diâmetro mensurado em microscópio invertido (Ti-S, Nikon).

Coleta de oócitos ovulados

Os oócitos ovulados foram obtidos de fêmeas com três semanas de idade por injeção intraperitoneal de 5 U.I. de eCG seguido de 5 U.I. de hCG (gonadotrofina coriônica humana; Sigma-Aldrich), com intervalo de 47 horas entre as injeções. Foi feita a eutanásia das fêmeas 12 horas após a administração de hCG, e os COCs foram obtidos por rompimento do oviduto (ampola) com agulha 30G (Figura 8).

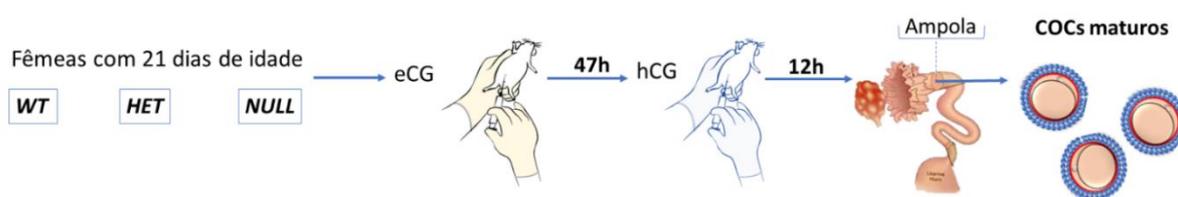


Figura 8. Obtenção de COCs ovulados. Foi utilizado fêmeas de 3 semanas provenientes dos 3 grupos (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}*). Primeiramente foi injetado por via intraperitoneal eCG, e após 47h foi injetado hCG, 12h depois foi possível coletar os COCs ovulados da ampola. As injeções de eCG e hCG foram aplicadas à noite.

Os oócitos foram desnudados das células do cumulus por pipetagem em *MEM-alpha* tamponado com HEPES contendo 0,3% de hialuronidase (Sigma Aldrich). Analisou-se o número de oócitos ovulados e a quantidade de oócitos com PB1 em microscópio invertido (Ti-S, Nikon) sob luz branca. Para confirmação da extrusão do PB1, os oócitos foram marcados com o corante fluorescente *Hoechst* (Sigma Aldrich - afinidade por DNA) na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ por 15 minutos em gota de tampão fosfato-salino (PBS; Sigma

Aldrich). Em seguida, os oócitos foram visualizados sob luz UV utilizando filtro azul (CHIARATTI *et al.*, 2010), (Figura 9). O diâmetro dos oócitos com PB1 também foi determinado, como acima.

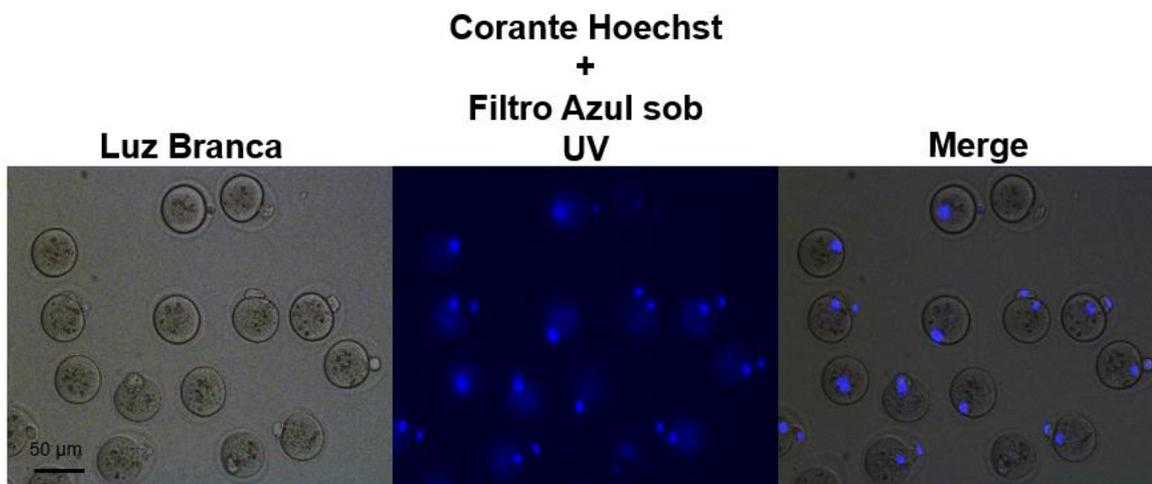


Figura 9. Avaliação da quantidade oócitos que extruíram o PB1. O corante hoechst marca DNA de células viáveis. Após a combinação das duas fotos (merge) foi possível visualizar a presença de oócitos com duas marcações ou com apenas uma marcação (cor azul), aqueles que apresentam duas marcações foram classificados com PB1 extruído.

NAD(P)H e FAD

Os oócitos imaturos (GV) e livres de células do cumulus foram transferidos para gotas de 200 µL de PBS contendo 0,01% de BSA (Sigma-Aldrich) e analisados em microscópio invertido (Ti-S, Nikon). As intensidades de autofluorescência de flavina-adeninadineotídeo (FAD) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (fosfato) (NAD[P]H) foram determinadas utilizando filtros verde e azul sob excitação de luz UV, respectivamente (ZENG *et al.*, 2014). As imagens foram capturadas com objetivas de 10x. As configurações do microscópio e da imagem foram mantidas constantes ao longo dos experimentos. As intensidades médias de autofluorescência dentro das imagens dos oócitos foram quantificadas com o *software NIS-Elements BR Analysis 4.30.01*. As medições de autofluorescência foram subtraídas pela média do branco (área fora dos oócitos) e foram expressas em relação ao controle selvagem (*Rad51^{fl/fl}*) de cada repetição. Esta análise foi realizada em pelo menos 12 oócitos por grupo experimental.

Microscopia confocal

Para determinação da população de mitocôndrias de alta polarização e baixa polarização foi utilizado o corante *JCI* (ThermoFisher Scientific) que emite fluorescência no verde (~525 nm) e vermelho (~590 nm). Os oócitos imaturos (GV) foram incubados em 1 mM de *JCI* por 30 minutos em meio *MEM-alpha* contendo 0,01 % BSA. Já para determinação do ROS nos oócitos, foi utilizado a sonda *CellRox* (ThermoFisher Scientific).

Um grupo de oócitos foi tratado por 5 minutos com H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) a 20 mM em meio *MEM-alpha* contendo 0,01% BSA, seguido de incubação em 5 mM de *CellRox* por 30min; outro grupo de oócitos foi simplesmente incubado com o *CellRox*, sem o tratamento com H₂O₂.

Todas as amostras incubadas com *JCI* e *CellRox* foram alocadas em placas apropriadas e examinadas em microscópio confocal (LSM710, Zeiss) utilizando objetiva de 63× e excitação/emissão ajustada para sonda, conforme recomendações dos fabricantes. Todas as imagens foram capturadas sob os mesmos parâmetros. As imagens foram analisadas utilizando o *software ImageJ* (NIH). A intensidade de fluorescência foi quantificada com auxílio de uma função de desenho circular realizada manualmente para cada região de interesse, neste caso, o oócito todo.

Análise do conteúdo de ATP

Foram coletados 25 oócitos imaturos (GV) para cada grupo, os quais foram guardados individualmente em 1 µL de PBS com 0,01 % de BSA (Sigma-Aldrich) e mantidos a -80°C até o uso. O conteúdo de ATP foi medido com base na reação de luciferina por meio de um kit de ATP (*ATP bioluminescent assay kit*) (Sigma Adrich). Os oócitos foram tratados com as soluções de reação (reagente de liberação de ATP, água ultrapura) e aplicados em uma placa branca de 96 poços, conforme recomendações do fabricante. A biolumiscência de cada amostra foi medida em SpectraMax i3® MiniMax™ no modo luminescência (ZENG *et al.*, 2014). O conteúdo da amostra de ATP foi calculado usando uma curva padrão gerada a partir de 6 concentrações de gradiente de ATP variando de 5 a 0,15625 pmol.

Análise estatísticas

As análises estatísticas e as representações gráficas dos resultados foram realizadas no GraphPad Prism 8 (Software GraphPad). Para as análises envolvendo três ou mais grupos, usamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por análise de múltipla comparação por *pairwise*. Para as análises contendo dois grupos, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Diferenças com valores de P menor que 0,05 foram consideradas significativas.

RESULTADOS

RESULTADOS

O nocaute condicional em homozigose do gene *Rad51* no oócito resulta em subfertilidade

Visando investigar o efeito da deficiência de RAD51 no oócito, fêmeas dos três grupos experimentais (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}*) foram acasaladas com machos selvagens. Machos e fêmeas foram mantidos juntos por um período total de 8 meses para acompanhamento do número de animais nascidos (Figura 10).

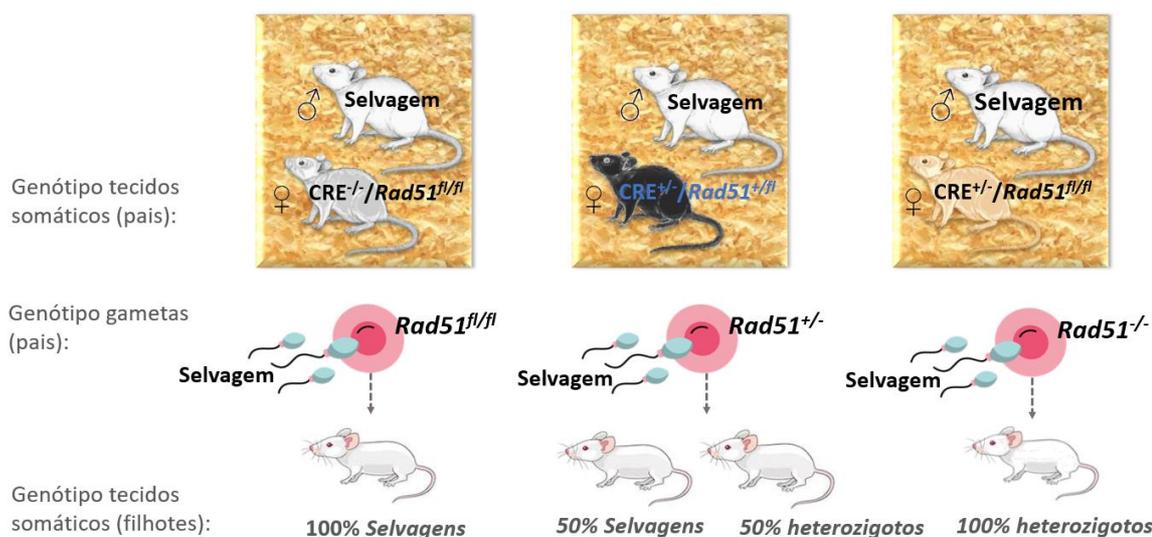


Figura 10. Teste de fertilidade. Fêmeas com oócitos *Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}* foram fecundadas com esperma *Rad51^{+/+}* (n de 3 matrizes por grupo). As matrizes de fêmeas com oócitos nocaute em heterozigose produziram filhotes 50% *Rad51^{+/+}* (selvagens) e *Rad51^{+/-}* (heterozigotos), em paralelo, fêmeas nocautes em homozigose produziram filhotes 100% *Rad51^{+/-}* (heterozigotos). Fonte: Autor.

Conforme apresentado na Tabela 4, não foi observada diferença entre as fêmeas dos três grupos (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}*) em relação ao número de ninhadas/fêmea. No entanto, o número de filhotes nascidos de fêmeas *Rad51^{-/-}* foi ~3,5 vezes inferior do que o observado no mesmo período para fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{+/-}* (Tabela 4). Este resultado fica bastante evidente quando o número médio de filhotes/fêmea é acompanhado mensalmente (Figura 11). O número de filhotes/ninhada para as fêmeas *Rad51^{-/-}* também foi significativamente inferior ao observado para os demais grupos: média de $2,8 \pm 0,2$ filhotes/ninhada para fêmeas *Rad51^{-/-}*, comparado com $8,8 \pm 0,4$ e $7,8 \pm 0,5$ filhotes/ninhada para fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{+/-}*, respectivamente (Tabela 4). Em suma, esses resultados fornecem evidências de que a RAD51 não é essencial para a fertilidade. Embora a deleção em homozigose de *Rad51* tenha sido compatível com o desenvolvimento a termo, fêmeas *Rad51^{-/-}* demonstraram clara evidência de subfertilidade. Em comparação, nenhum efeito foi observado sobre a fertilidade de fêmeas *Rad51^{+/-}*.

Tabela 4: Avaliação da fertilidade de fêmeas $Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$, $Rad51^{-/-}$

Grupos	n	Ninhadas	Filhotes	Nº filhotes/ninhada	ninhada/fêmea
$Rad51^{fl/fl}$	3	18	160	$8,8 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,5$
$Rad51^{+/-}$	3	22	172	$7,8 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,3$
$Rad51^{-/-}$	3	16	46	$2,8 \pm 0,2^{****}$	$5,3 \pm 0,3$

Obs. Para a realização deste experimento, utilizamos um número de 3 fêmeas por grupo que foram mantidas com machos selvagens, com o intuito de avaliar a fertilidade das fêmeas, para isso consideramos as seguintes variáveis: número total de ninhadas e filhotes, relação número de filhotes por ninhada e número de ninhadas por fêmea. O ensaio teve duração de 8 meses. Diferença estatística **** $P < 0,0001$.

Além disso, o número de filhotes acumulado mensalmente durante o período experimental pelas fêmeas do grupo $Rad51^{-/-}$ também foi significativamente menor em relação as fêmeas dos grupos $Rad51^{fl/fl}$ e $Rad51^{+/-}$, o que caracteriza um quadro de subfertilidade nas fêmeas nocaute em homozigose para o gene $Rad51$ (Figura 11).

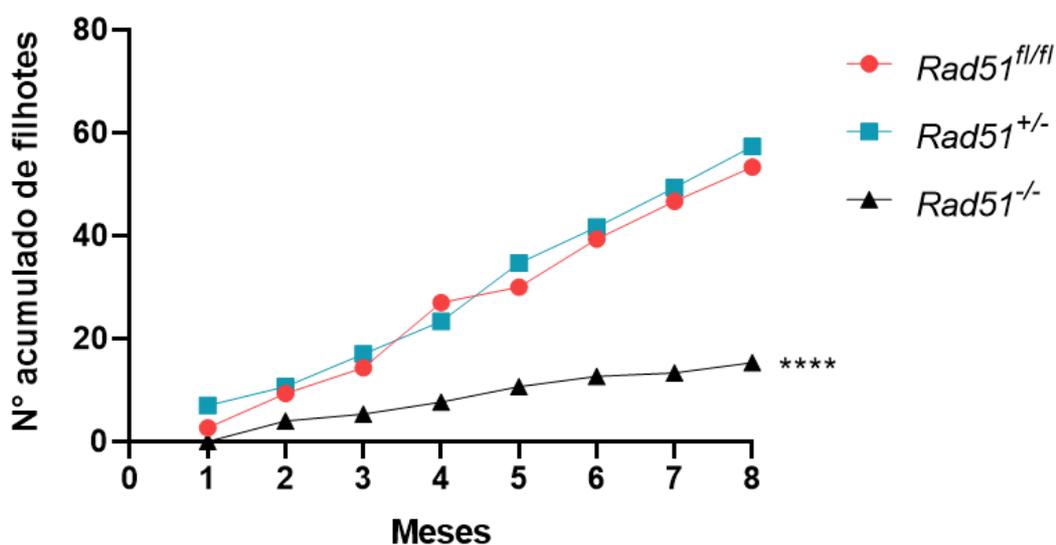


Figura 11. Número de filhotes acumulado mensalmente. Somatório da média de filhotes por mês provenientes dos grupos $Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$ e $Rad51^{-/-}$ (3 fêmeas por grupo). As fêmeas $Rad51^{-/-}$ diferiram estatisticamente de $Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$, **** $(P < 0,0001)$, caracterizando um quadro de subfertilidade nas fêmeas nocautes em homozigose para o gene da $Rad51$.

Mortalidade de filhotes provenientes de oócito $Rad51^{-/-}$

Como descrito anteriormente, as fêmeas $Rad51^{-/-}$ produziram um total de 46 filhotes. Destes, 14 morreram antes do desmame, resultando em uma taxa de mortalidade de 30,43%, a maior parte dos filhotes morreram nos primeiros quatro dias de vida (Figura 12).

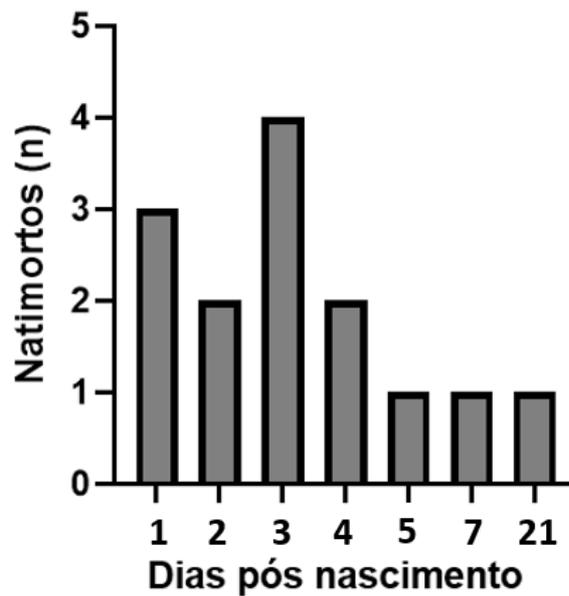


Figura 12. Mortalidade de filhotes oriundos de oócitos *Rad51*^{-/-} antes do desmame. Foi observado a morte de um total de 14 filhotes provenientes de oócitos *Rad51*^{-/-}, que se distribuíram ao longo dos 21 dias iniciais de vida. A maior quantidade de neonatos mortos foi durante os 4 primeiros dias após o nascimento, totalizando 11 mortes. Passado este período, apenas 3 neonatos morreram, distribuídos nos dias 5, 7 e 21.

É importante destacar que 100% das progênie de fêmeas do grupo *Rad51*^{-/-} era heterozigota para a *Rad51*, enquanto que esta percentagem foi igual a 50% na progênie de fêmeas *Rad51*^{+/-}. Apesar disso, a taxa de mortalidade da progênie de fêmeas *Rad51*^{+/-} foi nula, sugerindo que os filhotes provenientes de oócitos *Rad51*^{+/-} são viáveis, diferentemente dos filhotes oriundos de oócitos *Rad51*^{-/-}, o que nos faz refletir sobre a baixa qualidade do gameta.

Dos 14 neonatos provenientes de oócitos *Rad51*^{-/-} que chegaram a óbito antes do desmame, alguns apresentaram alterações anatômicas e diferenças no peso corporal; dados compatíveis com um possível atraso no desenvolvimento (Figura 13 a, b, c).

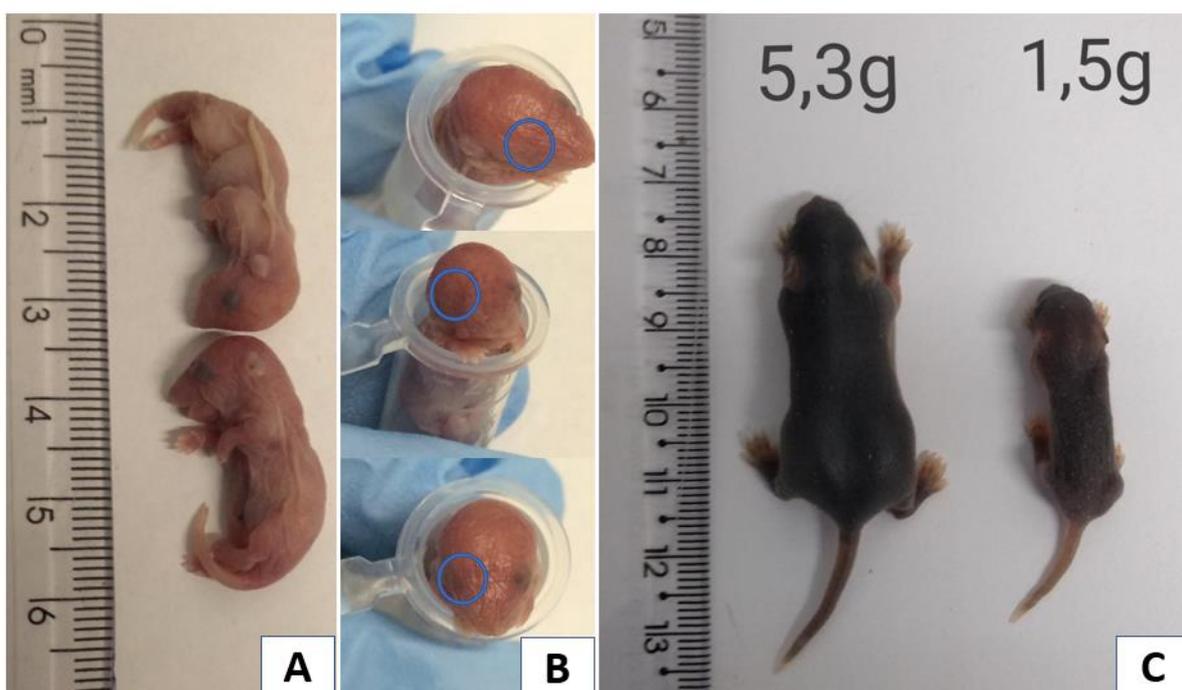


Figura 13. Neonatos provenientes de oócitos *RAD51*^{-/-} que chegaram a óbito. a) Neonatos que morreram dias após o nascimento (n = 14); b) Neonato com alteração anatômica, ausência de um olho (n = 1), indicado pelo círculo; c) filhotes provenientes da mesma ninhada apresentando grande diferença no peso corporal (desnutridos) (n=2).

Com o intuito de investigar sobre a viabilidade dos filhotes provenientes de oócitos *Rad51*^{-/-} que sobreviveram ao desmame, analisamos o ganho de peso total ao longo de 6 semanas. O índice de ganho de peso foi significativamente menor na progênie derivada de oócitos *Rad51*^{-/-} (Figura 14). É interessante salientar que o menor número de filhotes/ninhada nas fêmeas *Rad51*^{-/-} pode ter afetado esse resultado, ou seja, é possível que o ganho de peso neste grupo seja ainda menor do que o observado. Em conjunto, esses resultados sugerem um impacto da deficiência de RAD51 sobre a viabilidade da progênie.

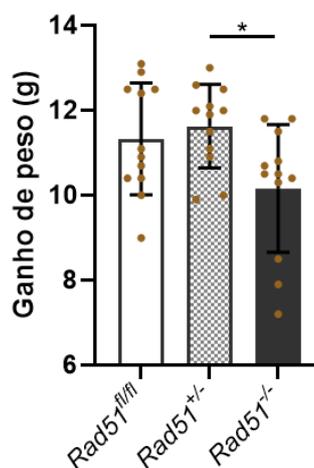


Figura 14. Ganho de peso total. As progênies oriundas de oócitos *Rad51*^{fl/fl}, *Rad51*^{+/-}, *Rad51*^{-/-} foram pesados semanalmente (n=12 fêmeas por grupo), e avaliou-se o ganho de peso entre a quinta semana (8ª semana de vida) subtraído pela primeira semana de pesagem (3ª semana de vida). As fêmeas provenientes de oócitos *Rad51*^{-/-} ganharam menos peso do que as fêmeas provenientes de oócito *Rad51*^{+/-}. *Diferença estatística (P=0,04).

Os oócitos de fêmeas $Rad51^{-/-}$ não apresentaram alterações durante o crescimento e/ou maturação.

Fêmeas ($Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$, $Rad51^{-/-}$) com 21-23 dias de idade, superovuladas com eCG tiveram os ovários coletados, dissecados, pesados e em seguida analisamos morfologicamente. As fêmeas dos três grupos experimentais não apresentaram alterações na morfologia ovariana (Figura 15) nem diferença no peso do ovário (Figura 16).

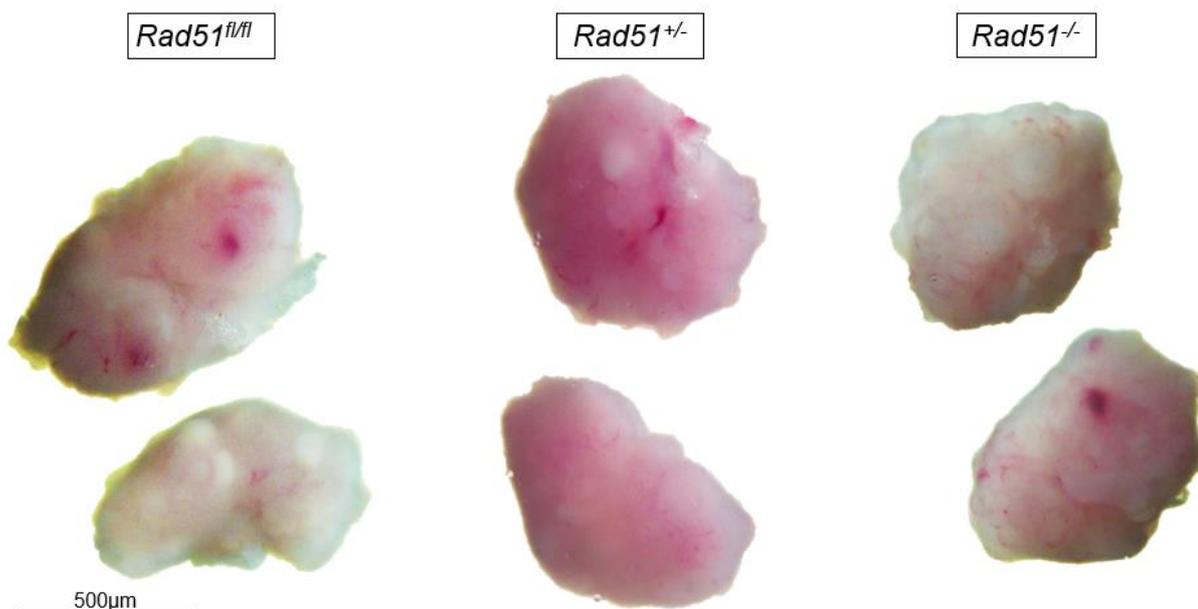


Figura 15. Ovários dissecados de fêmeas com 3 semanas dos grupos $Rad51^{fl/fl}$, $Rad51^{+/-}$, $Rad51^{-/-}$. Ambos órgãos não apresentaram diferenças na morfologia ovariana.

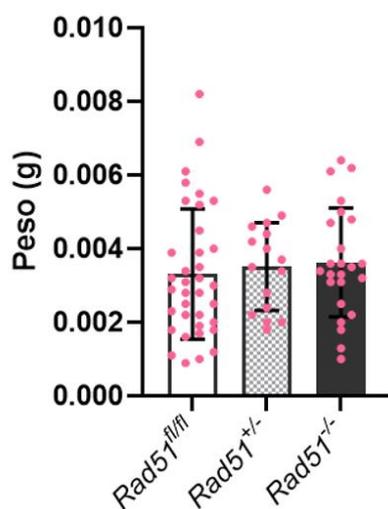


Figura 16. Peso de ovários. As fêmeas nocaute condicional $Rad51^{+/-}$ e $Rad51^{-/-}$ não diferiram do controle em relação ao peso ovariano. (n= 36 ovários controle versus 16 e 24 ovários provenientes de fêmeas nocaute condicional para o oócito $Rad51^{+/-}$ e $Rad51^{-/-}$, respectivamente). Não foi observada diferença estatística.

Posteriormente, foi analisada a morfologia dos COCs oriundos desses ovários em microscópio invertido sob luz transmitida. Como resultado, não foi observada alteração entre

COCs representativos de cada genótipo (Figura 17 a, b, c). No geral, os oócitos apresentaram citoplasma escuro, aspecto ligeiramente granular e estavam repletos de células do cumulus.

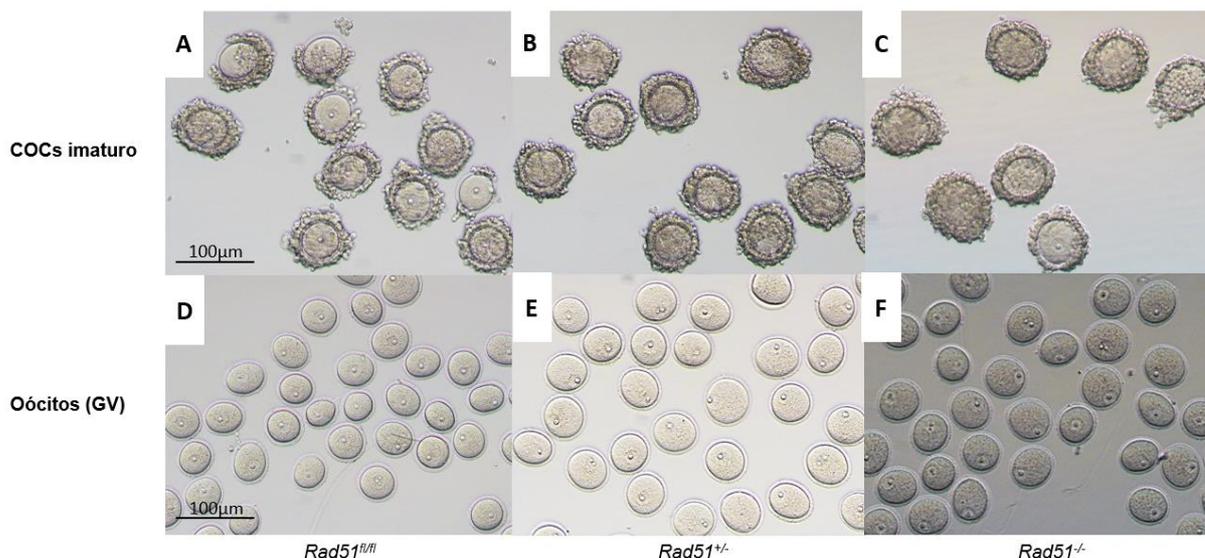


Figura 17. COCs e oócitos desnudos (GV). a, b, c) Complexos cumulus-oócitos (COCs) imaturos provenientes de camundongos com 3 semanas de idade. Comparação da morfologia dos COCs entre os três respectivos (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}*). Não foi encontrado nenhuma alteração na morfologia dos COCS entre os grupos. D, E, F) Oócitos imaturos obtidos após desnudamento das células do cúmulus COCs provenientes dos três respectivos grupos (*Rad51^{fl/fl}*, *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}*).

Para complementar a análise morfológica dos COCs, os oócitos tiveram as células do cúmulus removidas por pipetagem para posterior determinação do diâmetro oocitário (Figura 17 d, e, f). Em comparação com o controle selvagem (*Rad51^{fl/fl}*), os oócitos de ambos os grupos nocaute (*Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}*) apresentaram maior diâmetro. Ademais, os oócitos *Rad51^{+/-}* apresentaram diâmetro superior ao de oócitos *Rad51^{-/-}*. Embora difícil de explicar, esses resultados sugerem um efeito deletério dos alelos *flxed* sobre o crescimento oocitário. Em consonância com essa hipótese, a comparação de oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{+/+}* (controles) evidenciou um menor diâmetro do primeiro em relação ao segundo quando também coletados de fêmeas com 21-23 dias após estímulo com eCG. Já quando comparamos o diâmetro de oócitos *Rad^{+/+}* (destituídos de alelos *flxed*), com oócitos *Rad51^{-/-}*, observamos uma redução no tamanho de oócitos *Rad51^{-/-}*. Esses resultados nos permitem concluir que os alelos *flxed* impactam o crescimento dos gametas (Figura 18).

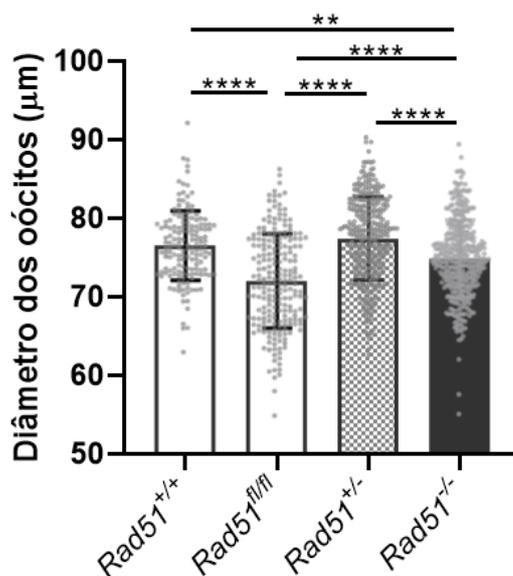


Figura 18. Diâmetro de oócitos imaturos (GV). Foram utilizados 157 oócitos *Rad51^{+/+}* de 4 animais, 216 oócitos *Rad51^{fl/fl}* de 7 animais, 338 oócitos *Rad51^{+/-}* de 8 animais *Rad51^{+/-}* e 383 oócitos de 5 animais *Rad51^{-/-}*. Diferença estatística (** $P=0,06$; **** $P<0,0001$) entre os grupos comparados.

Em contraste com a subfertilidade de fêmeas *Rad51^{-/-}*, nenhum efeito deletério da deficiência de RAD51 foi observado sobre o desenvolvimento do oócito. No entanto, uma vez que a subfertilidade desses animais poderia estar atrelada a uma possível deficiência ovulatória, fêmeas com 3 semanas de idade foram estimuladas com eCG e hCG para análise dos oócitos ovulados. Como resultado, o número de ovulados total e o de oócitos com PB1 não diferiram entre os grupos. Também não foi encontrado efeito sobre a morfologia (Figuras 19 e 20 a, b, c).

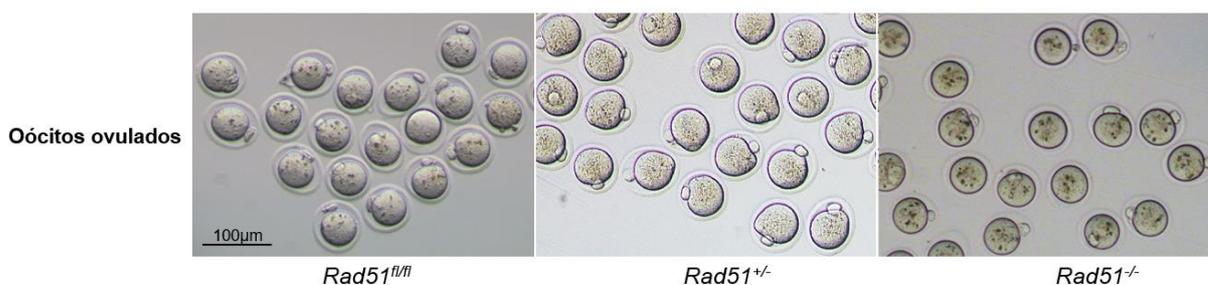


Figura 19. Oócitos ovulados. Fêmeas dos grupos *Rad51^{+/-}*, *Rad51^{-/-}* ovularam normalmente, assim como observado nas fêmeas controle.

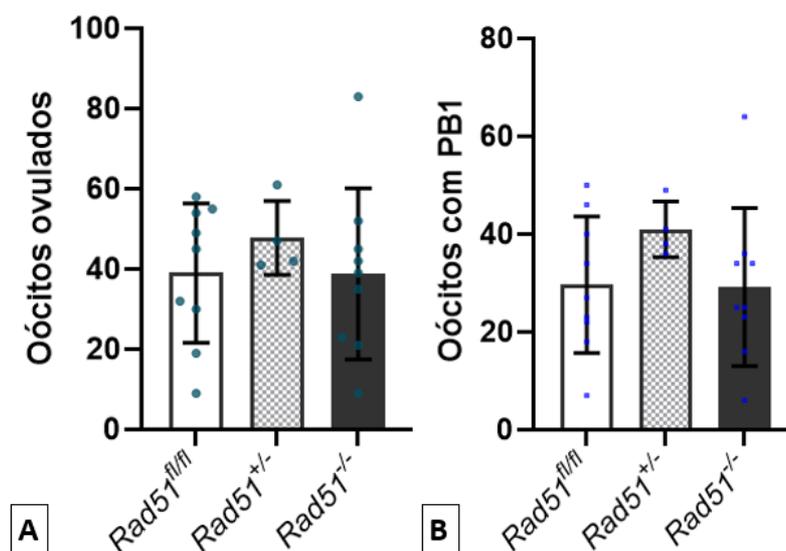


Figura 20. Quantidade de oócitos ovulados, extrusão de PB1 e diâmetro. a, b) Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação a quantidade total de oócitos ovulados e da extrusão do 1ºPB. Os oócitos *Rad51^{+/-}* e *Rad51^{-/-}* se comportaram semelhantemente ao controle (n=9 fêmeas *Rad51^{fl/fl}*, 4 fêmeas *Rad51^{+/-}* e 9 fêmeas *Rad51^{-/-}*). Não foi observado nenhuma diferença estatística.

Em suma, esses resultados indicam que a deleção da *Rad51* não afetou o crescimento do oócito, tão pouco impediu a retomada da divisão meiótica, progressão até o estágio de metáfase II e ovulação. Portanto, é possível que a subfertilidade determinada pela deficiência de RAD51 seja explicada por um efeito deletério que se manifestou após a fecundação.

Oócitos *Rad51^{-/-}* não apresentaram disfunção mitocondrial

Com intuito de investigar a causa da subfertilidade determinada pela deficiência de RAD51, a função mitocondrial foi primeiramente analisada por determinação dos níveis de NAD(P)H e FAD em oócitos imaturos. Vale mencionar que o grupo *Rad51^{+/-}* foi excluído das análises abaixo uma vez que não foi observado efeito deletério do nocaute em heterozigose sobre a fertilidade.

O dinucleotídeo de adenina nicotinamida funciona como principal transportador de elétrons, podendo ser encontrado na célula em sua forma reduzida (NADH), oxidada (NAD⁺) e fosforilada (NADPH ou NADP⁺). Da mesma forma, o grupo protético dinucleotídeo adenina flavina também é um transportador de elétrons e pode ser encontrado em sua forma reduzida (FADH₂) e oxidada (FAD). Desses cofatores redox, apenas NADH, NADPH e FAD são autofluorescentes (CHANCE *et al.*, 1979), permitindo inferir sobre a atividade metabólica por meio da determinação dos níveis de autofluorescência destes; o potencial metabólico coincide com a proporção de substratos metabólicos reduzidos e oxidados (BRIGELIUS-FLOHÉ & FLOHÉ, 2011; CHANCE *et al.*, 1979). No entanto, a análise dos níveis de NAD(P)H e FAD

nos oócitos não indicou diferença entre os grupos, sugestivo de que a atividade metabólica não foi alterada pela deficiência de RAD51 (Figura 21 a, b, c).

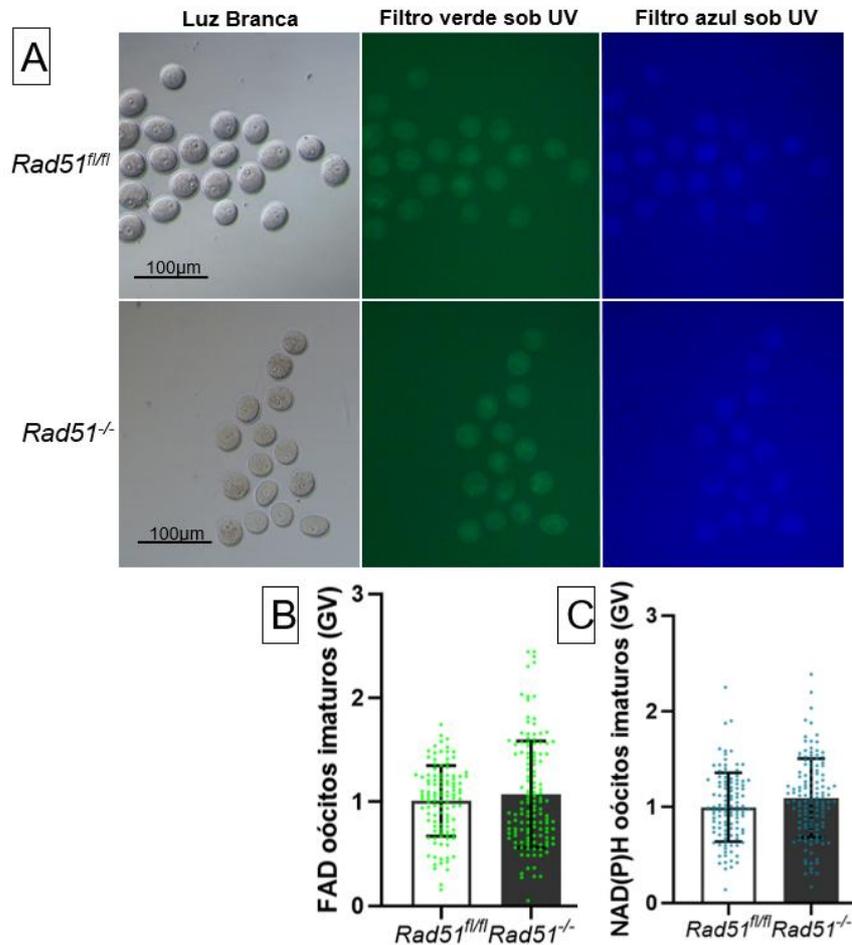


Figura 21. Imagens de autofluorescência de oócitos imaturos e quantificação de FAD e NAD(P)H. a) Para a obtenção das imagens de autofluorescência, a forma oxidada de flavoproteínas (FAD) foi excitada pela utilização de UV e a fluorescência emitida foi coletada em filtro verde (505–550nm) as formas reduzidas de nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) foram também excitadas pela luz ultravioleta sob filtro azul (435 e 485nm); b) Normalização do conteúdo de FAD de oócitos do grupo *Rad51^{-/-}* em relação ao grupo controle, não foi encontrado diferença significativa (n=6 animais de cada grupo sendo 111 oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 129 oócitos *Rad51^{-/-}*); c) Normalização do conteúdo de NAD(P)H de oócitos do grupo *Rad51^{-/-}* em relação ao grupo controle, não foi encontrado diferença significativa (n=6 animais de cada grupo sendo 112 oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 127 oócitos *Rad51^{-/-}*).

Para dar suporte aos achados de FAD e NAD(P)H, o $\Delta\Psi_m$ foi determinado utilizando a sonda *JCI*. O $\Delta\Psi_m$ é utilizado como um indicador da atividade mitocondrial. Em organelas de baixo $\Delta\Psi_m$, o *JCI* se acumula de forma monomérica e fluoresce na cor verde (comprimento de onda igual a ~525 nm); já em organelas com maior potencial, a fluorescência do *JCI* passa para vermelho (comprimento de onda igual a ~590 nm) devido à sua multimerização e formação de “agregados-J” (VAN BLERKOM *et al.*, 2003). O $\Delta\Psi_m$ é determinado de forma relativa pela razão das fluorescências vermelho/verde do *JCI*. Em consonância com a análise de NAD(P) e FAD, encontramos que a razão vermelho/verde do

JC1 foi similar entre oócitos $Rad51^{fl/fl}$ e $Rad51^{-/-}$ (Figura 22 a, b).

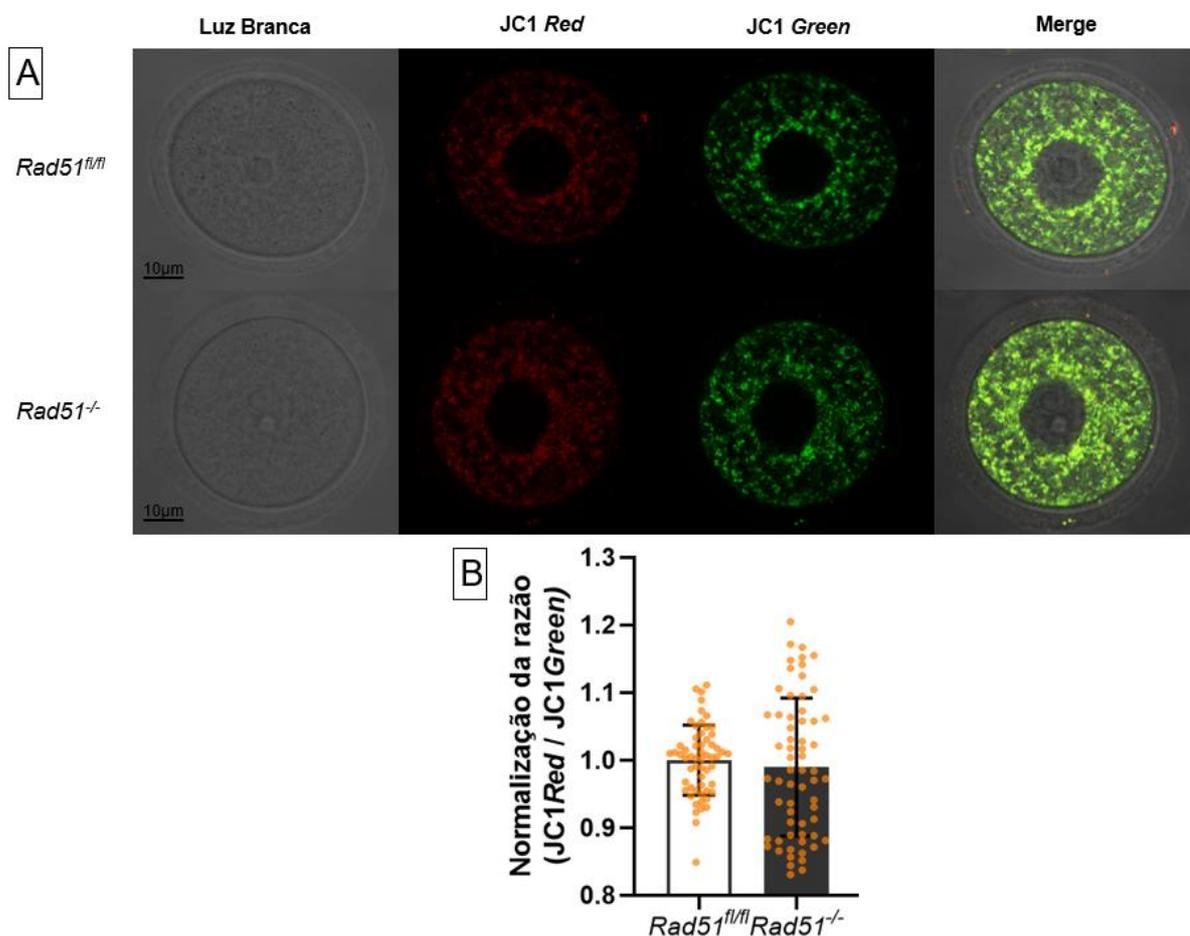


Figura 22. Imagens de fluorescência JC1 de oócitos imaturos e quantificação do potencial de membrana mitocondrial. a) Obtenção das imagens de fluorescência verde (~525nm) e vermelho (~590nm) b) Normalização da razão de mitocôndrias de alta polarização (vermelho) por mitocôndrias de baixa polarização (verde) em relação ao grupo controle, não foi encontrada diferença significativa (n=5 animais para cada grupo sendo 58 oócitos $Rad51^{fl/fl}$ e 63 oócitos $Rad51^{-/-}$).

Oócitos imaturos (GV) também tiveram o conteúdo total de ATP determinado. As quantidades médias de ATP nos oócitos $Rad51^{fl/fl}$ e $Rad51^{-/-}$ foram de $0,964 \pm 0,03$ pmol e $0,962 \pm 0,03$ pmol, respectivamente, não sendo observada diferença estatística entre os grupos (Figura 23).

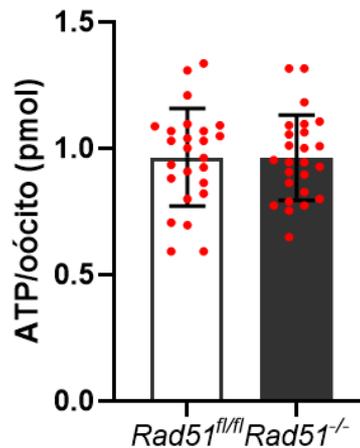


Figura 23. Níveis de ATP em oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*. O nocaute em homozigose da *Rad51* não afetou a produção de ATP, não houve diferença estatística (n=5 animais para cada grupo, sendo 25 oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 25 oócitos *Rad51^{-/-}*). Não foi observada diferença estatística.

Por fim, os níveis de ROS foram determinados nos oócitos por uso da sonda *CellRox*. O ROS foi avaliado tanto sob condição basal (figura 24), como após estímulo com H_2O_2 (figura 25). Uma vez que ~90% do ROS tem origem na mitocôndria, devido a redução incompleta do O_2 a H_2O , o nível de ROS é comumente utilizado como indicador da atividade mitocondrial (DADA *et al.*, 2003). Diferente dos resultados acima, a análise da fluorescência do *CellRox* sob condição basal indicou possível disfunção mitocondrial nos oócitos *Rad51^{-/-}*. O mesmo resultado foi observado sob estímulo com H_2O_2 .

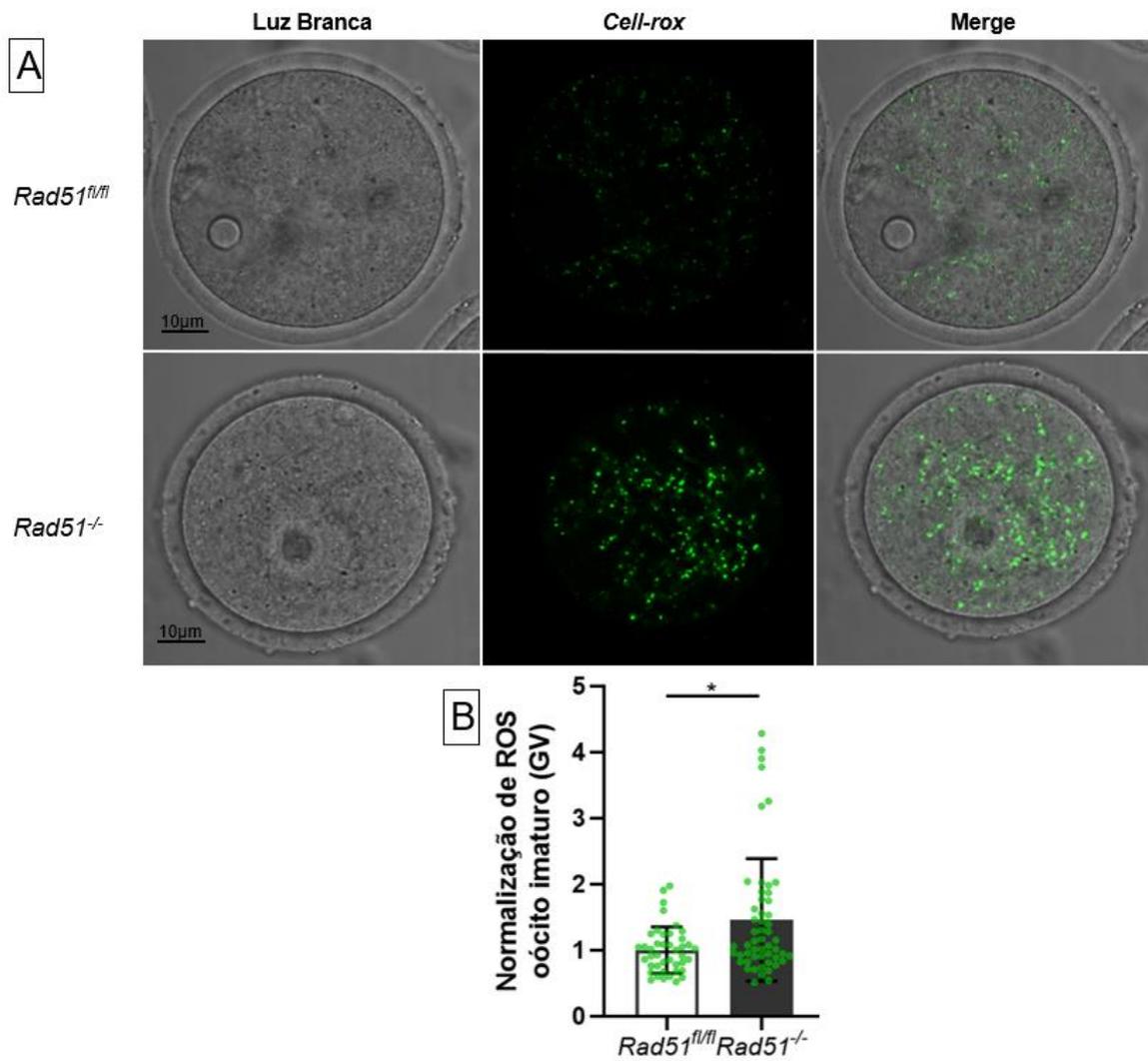


Figura 24. Conteúdo de ROS em oócitos imaturos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*. a) Imagens de fluorescência da marcação de espécies reativas de oxigênio (verde), é visualmente perceptível que os oócitos *Rad51^{-/-}* apresentaram maior intensidade de fluorescência; b) Quantificação de ROS normalizado em relação ao controle, os oócitos imaturos *Rad51^{-/-}* possuem maior quantidade de ROS, *diferença estatística (P=0,01) entre os grupos comparados (n de 4 animais para cada grupo sendo 42 oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 53 oócitos *Rad51^{-/-}*).

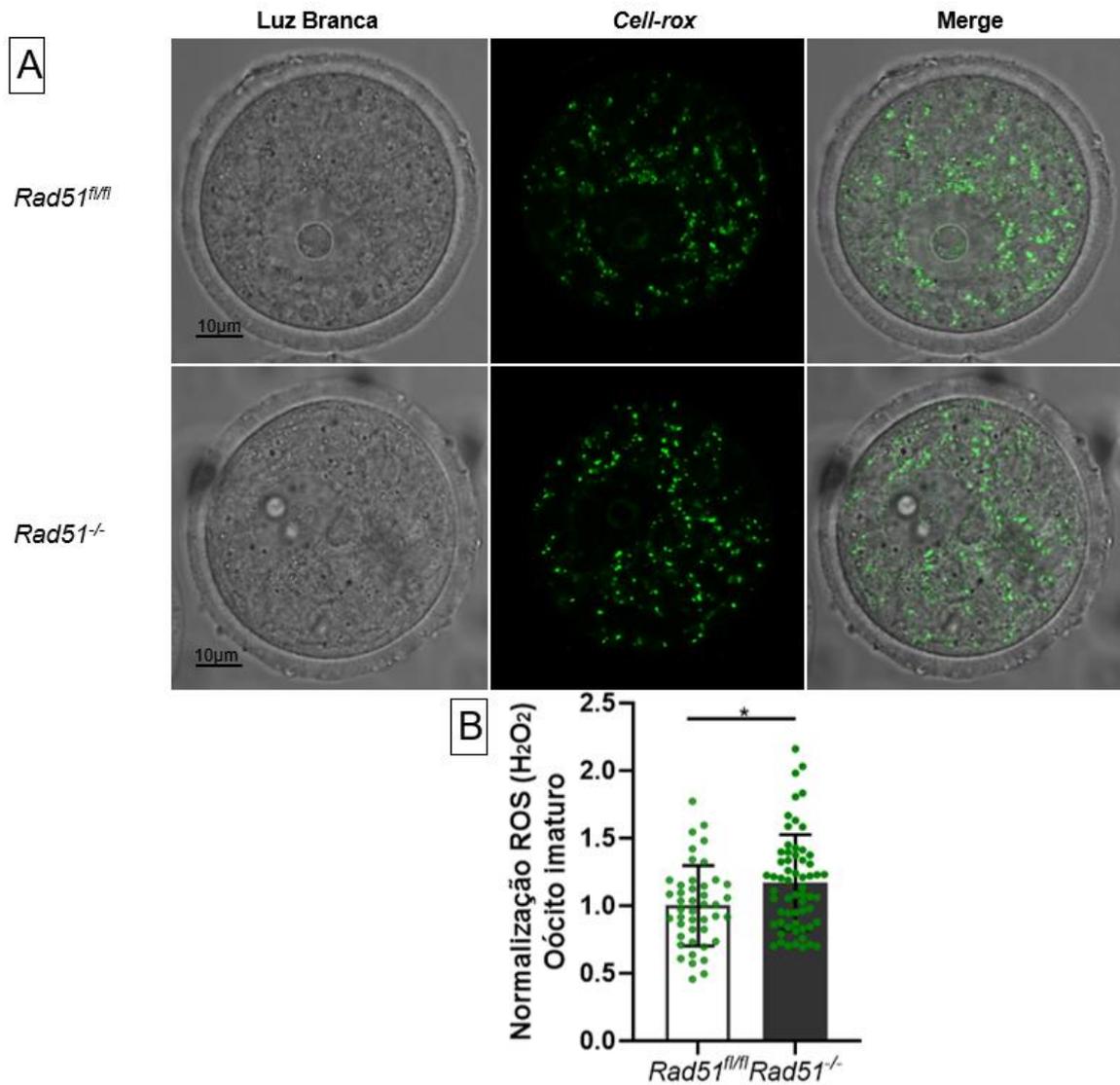


Figura 25. Conteúdo de ROS em oócitos imaturos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* após tratamento com H₂O₂. a) Imagens de fluorescência da marcação de espécies reativas de oxigênio (verde), após tratamento com peróxido de hidrogênio, os oócitos *Rad51^{-/-}* diferiram do controle b) Quantificação de ROS após tratameno com H₂O₂ normalizado em relação ao controle, os oócitos *Rad51^{-/-}* maior conteúdo de ROS, diferença estatística (P<0,01) entre os grupos comparados (n de 4 animais sendo 44 oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 61 oócitos *Rad51^{-/-}*).

Em conjunto, esses achados demonstram que a subfertilidade de fêmeas *Rad51^{-/-}* não é explicada por um possível efeito sobre a função mitocondrial no oócito. Apesar do conteúdo de ROS ter se mostrado superior em oócitos *Rad51^{-/-}*, esse indício de disfunção mitocondrial não foi respaldado por outras análises como nos níveis de NAD(P)H, FAD, $\Delta\Psi$ m e ATP.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente trabalho, fornecemos evidências de que a deleção oócito-específica de *Rad51* é compatível com o desenvolvimento do oócito até a ovulação, porém resulta em subfertilidade em murinos, caracterizado pelo número reduzido de filhotes por ninhada. Além disso foi observada uma taxa de mortalidade de 30,4% dos filhotes provenientes de oócitos *Rad51*^{-/-}, o que reflete um impacto da deficiência de RAD51 sobre a viabilidade da progênie. Mas 69,6% dos filhotes conseguiram sobreviver pós-desmame com ganho de peso menor em relação ao controle, e foram considerados viáveis.

Na tentativa de explicar estes efeitos, realizamos análises com foco principalmente na mitocôndria, porém não identificamos nenhuma alteração no oócito que pudesse explicar o impacto sobre a fertilidade. A avaliação morfológica dos COCs em oócitos deficientes de RAD51 não revelou nenhuma alteração sugestiva de impacto sobre a viabilidade do gameta. De forma similar, não foi observado em oócitos imaturos (GV) efeito sobre os níveis de NADH(P)H, FAD, $\Delta\Psi_m$ e ATP. Esses resultados contrariam nossa hipótese inicial e sugerem que a RAD51 não é essencial durante essa fase do desenvolvimento da linhagem germinativa da fêmea. De fato, do ponto de vista do seu papel na progressão meiótica, não eram esperados efeitos nucleares em oócitos imaturos uma vez que a RAD51 deveria exercer função mais essencial em estágio posterior da foliculogênese (*e.g.*, durante a maturação oocitária) (KUZNETSOV *et al.*, 2007). No entanto, um trabalho recente mostrou que a indução de DSBs (por tratamento com etoposide) em oócitos imaturos resulta na formação de agregados de RAD51 em regiões coincidentes com agregados de γ H2AX no núcleo; em comparação, oócitos não tratados com etoposide não apresentam agregados de RAD51 no núcleo a despeito da inexistência de DSBs e acúmulo de γ H2AX (MA *et al.*, 2019). Portanto, a RAD51 deve atuar nos oócitos imaturos no reparo de DSBs, mas talvez a frequência de ocorrência dessas não tenha sido elevada o suficiente para determinação de efeito sobre a viabilidade dos oócitos *Rad51*^{-/-}.

Recentemente, foi demonstrado que a interferência por RNA (RNAi) sobre a expressão de *Rad51* durante a maturação oocitária resulta em bloqueio da meiose no estágio de metáfase I. Os oócitos apresentaram desalinhamento cromossômico e falhas na formação da placa metafásica, o que foi acompanhado por reduzidos níveis de $\Delta\Psi_m$ e ATP no oócito (KIM *et al.*, 2016). Esse contraste de efeitos em comparação com o nosso trabalho é possivelmente explicado pela redução abrupta dos transcritos codificantes de *Rad51* utilizando RNAi. Outros trabalhos semelhantes já observaram diferenças nesse sentido ao

comparar modelos de nocaute e RNAi, o que possivelmente se deve a uma adaptação sistêmica no caso de animais nocautes. Assim, é possível que a deleção oócito-específica de RAD51 no nosso caso também tenha resultado em alteração de expressão de outros genes com função semelhante a RAD51, possivelmente minimizando o efeito da sua deficiência no oócito.

Considerando que a atividade mitocondrial está intrinsecamente associada a viabilidade do oócito (SANTOS *et al.*, 2006), os níveis normais de NAD(P)H e FAD corroboram nossos achados acerca da viabilidade dos oócitos *Rad51^{-/-}* (CHANCE *et al.*, 1979; ACTON *et al.*, 2004; WILDING, M. *et al.*, 2002; BRIGELIUS-FLOHÉ & FLOHÉ, 2011). NADH e FADH₂ têm o importante papel de carregarem elétrons oriundos da oxidação de substratos energéticos (*e.g.*, glicólise e ciclo de Krebs) até os complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons, enquanto que NADPH (no citosol e mitocôndrias) serve para rejuvenescer a defesa antioxidante, reduzindo peroxiredoxinas, tioredoxina e glutathione oxidada. (MITCHELL, 1961; FRIEDMAN & NUNNARI, 2014; IGOSHEVA *et al.*, 2010). Qualquer alteração na oxidação e/ou redução desses metabólitos podem alterar principalmente o potencial de membrana e produção de ATP, pois estes influenciam de forma direta na atividade respiratória mitocondrial (IGOSHEVA *et al.*, 2010). Uma vez que níveis semelhantes de NAD(P)H e FAD foram observados em oócitos *Rad51^{-/-}* e *Rad51^{fl/fl}*, podemos inferir que nem redução nem a oxidação desses aceptores foi afetada pela deficiência de RAD51 no oócito.

Com relação ao $\Delta\Psi_m$, este também não diferiu entre oócitos *Rad51^{-/-}* e o controle selvagem. Além de ser essencial para várias funções da mitocôndria, o $\Delta\Psi_m$ é um importante indicador da saúde mitocondrial. O $\Delta\Psi_m$ é formado pelo bombeamento de H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, processo este acoplado ao transporte de elétrons pelos complexos I, III e IV. Em casos de disfunção mitocondrial, o baixo $\Delta\Psi_m$ pode ser explicado, entre outros, pelo transporte deficiente de elétrons, defeito no bombeamento de H⁺ e alterações na integridade da membrana mitocondrial interna (WILDING, *et al.*, 2001; VAN BLERKOM *et al.*, 2002). De forma similar, disfunções mitocondriais podem impactar os níveis de ATP por ser este principalmente formado na mitocôndria. Embora aqui tenhamos determinado o conteúdo total de ATP no oócito, vários relatos anteriores já reportaram redução desse em oócitos com função mitocondrial deficiente. No caso de oócitos imaturos, as células do cumulus contribuem com o gameta no fornecimento de várias moléculas energéticas, incluindo piruvato e ATP. Portanto, a

presença de níveis normais de $\Delta\Psi_m$ e ATP atesta tanto em favor da viabilidade dos oócitos *Rad51*^{-/-}, como também da integridade da interação oócito-cumulus.

No que concerne ao elevado nível de ROS nos oócitos *Rad51*^{-/-}, este resultado contraria outros achados deste trabalho que indicam que a deficiência de RAD51 não impacta a função mitocondrial e a viabilidade do gameta. Cerca de 90% do ROS celular tem origem nas mitocôndrias e seu aumento decorre, entre outros, da redução incompleta do O₂ a H₂O e da ação deficiente de enzimas antioxidantes. A menor expressão, por exemplo, de poli-peptídeos que compõem os complexos da cadeia transportadora de elétrons tem sido associada a maior geração de ROS (AGARWAL *et al.*, 2012). Uma vez que os oócitos *Rad51*^{-/-} não apresentaram alterações na atividade metabólica e função mitocondrial, é possível que o aumento de ROS decorra da reduzida expressão/atividade de enzimas antioxidante. Embora esta hipótese careça de confirmação, o maior conteúdo de ROS sugere uma menor viabilidade dos oócitos *Rad51*^{-/-}, o que poderia estar associado ao efeito sobre a fertilidade (PRASAD *et al.*, 2016).

Em consonância com os resultados acima, não observamos diferença na taxa de ovulação ou extrusão do PB1 entre animais selvagens e *Rad51*^{-/-}. Esse resultado era inesperado pois, como dito acima, era esperado que a RAD51 desempenhasse papel indispensável na progressão da meiose. Por exemplo, Kim *et al.* observaram que a interferência durante a maturação *in vitro* sobre a expressão de RAD51 resulta em bloqueio de ~76,5% dos oócitos (comparado com 8,5% no grupo controle) em meiose I, sendo que a taxa de extrusão do PB1 foi de somente ~23,5% (comparado com 91,5% no grupo controle) (KIM *et al.*, 2016). Por outro lado, Ma *et al.* reportaram um efeito benéfico da deficiência de RAD51 quando oócitos murinos foram tratados com etoposide antes da maturação. Os autores justificam que a deficiência de RAD51 minimiza a ocorrência de ligações cruzadas entre os homólogos, facilitando a disjunção cromossômica ao término da meiose I. Esse achado, no entanto, não isenta os oócitos de outras anomalias cromossômicas (*e.g.*, DSBs não reparadas) decorrentes da deficiência de RAD51 (MA *et al.*, 2019).

Anteriormente, um trabalho também com camundongos envolvendo a deficiência de RAD51C (paróloga de RAD51) revelou que 11,6% das fêmeas eram inférteis (KUZNETSOV *et al.*, 2007). No entanto, neste trabalho foram utilizados animais *Rad51c*^{neo/-} em que um dos alelos da *Rad51c* era nulo e outro hipomórfico; a introdução da sequência codificante de neomicina no intron 1 da *Rad51c* resultou em splicing aberrante e redução da expressão de *Rad51c* em ~60%. Como consequência, animais *Rad51c*^{neo/-} expressavam em

seus diferentes tecidos 5-30% dos níveis normais de RAD51C (KUZNETSOV *et al.*, 2007). A análise de fêmeas *Rad51c^{neo/-}* inférteis indicou possível deficiência na ovulação (*e.g.*, conforme caracterizado pela ausência de corpo lúteo em animais com 6 a 12 semanas), a qual foi revertida por superovulação com gonadotrofinas (KUZNETSOV *et al.*, 2007). O acasalamento de fêmeas *Rad51c^{neo/-}* estimuladas com gonadotrofinas resultou na obtenção de fetos com desenvolvimento comprometido, o qual se associou ao alinhamento anormal dos cromossomos nos oócitos em estágio de metáfase I. A cariotipagem dos oócitos em metáfase II revelou separação precoce das cromátides irmãs, o que sugere um possível defeito na coesão das cromátides explicado pela resolução deficiente das junções Holliday nos oócitos *Rad51c^{neo/-}* (KUZNETSOV *et al.*, 2007).

A semelhança de funções entre a RAD51 e a RAD51C leva a crer que a infertilidade de fêmeas *Rad51c^{neo/-}* também seja explicada por efeito tardio no reparo recombinacional durante o desenvolvimento do oócito. A princípio, essa hipótese não corrobora o nosso achado de que fêmeas *Rad51^{-/-}* ovulam normalmente, com taxa de extrusão do PB1 semelhante ao observado em animais selvagens. No entanto, como demonstrado por Ma *et al.*, é possível que a deficiência de RAD51 tenha facilitado a extrusão de PB1, independente de outros efeitos sobre a estabilidade cromossômica (MA *e colab.*, 2019). Somado a observação de que oócitos *Rad51^{-/-}* sustentam o desenvolvimento a termo, fica evidente que a deficiência de RAD51 teve impacto mais brando sobre o oócito do que a deficiência de RAD51C. Embora ainda careça de confirmação, muito possivelmente a deficiência de RAD51 só apresentou efeito sobre o desenvolvimento após a fecundação. Em linha com essa hipótese, trabalhos anteriores envolvendo o nocaute da *Rad51* durante o desenvolvimento embrionário inicial forneceram evidências de uma função essencial da RAD51 após a fecundação. Enquanto Tsuzuki *et al.* (TSUZUKI *et al.*, 1996) reportaram que embriões *Rad51^{-/-}* bloqueiam o desenvolvimento no estágio de 4-8 células, Lim & Hasty encontraram que o bloqueio ocorre após a implantação, entre os dias 5,5 e 7,5 (LIM & HASTY, 1996). Considerando no presente trabalho o desenvolvimento a termo a partir da fecundação de oócitos *Rad51^{-/-}*, é possível inferir que a expressão de *Rad51* a partir do alelo paterno durante os primeiros estádios da embriogênese tenha possibilitado alguns embriões ultrapassarem o bloqueio desenvolvimental de embriões *Rad51^{-/-}*.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A RAD51 não é essencial para o desenvolvimento do oócito em murinos, sendo a sua deficiência compatível com desenvolvimento a termo. Embora fêmeas com deleção oócito-específica de RAD51 demonstrem subfertilidade, este fenótipo não se associa com efeito evidente sobre a viabilidade oocitária ou a função mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, B M e colab. **Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development.** *Molecular Human Reproduction*, v. 10, n. 1, p. 23–32, 2004.
- AGARWAL, A. e APONTE-MELLADO, A. e PREMKUMAR, B. J. **The effects of oxidative stress on female reproduction: a review.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 10, n. 49, p. 1–31, 2012.
- AMBROSE, Mark e GATTI, Richard A. **Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: The next generation of ATM functions.** *Blood*, v. 121, n. 20, p. 4036–4045, 2013.
- BINELLI, Mario e MURPHY, Bruce D. **Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells.** *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2010.
- BRIEN, Marilyn J O e colab. **A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence 1 Protocols for Oocyte Development In Vitro.** *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1682–1686, 2003.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina e FLOHÉ, Leopold. **Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors.** *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 15, n. 8, p. 2335–2381, 2011.
- CARNEY, James P. e colab. **The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response.** *Cell*, v. 93, n. 3, p. 477–486, 1998.
- CARROLL, John e MARANGOS, Petros. **The DNA damage response in mammalian oocytes.** *Frontiers in Genetics*, v. 4, p. 1–9, 2013.
- CHANCE, B. e colab. **Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n. 11, p. 4764–4771, 1979.
- CHIARATTI, Marcos R e colab. **Embryo Mitochondrial DNA Depletion Is Reversed During Early Embryogenesis in Cattle 1.** *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 76–85, 2010.
- CHINNERY, P. F. e colab. **The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations.** *Annals of Neurology*, v. 48, n. 2, p. 188–193, 2000.
- CHOI, Y. e RAJKOVIC, A. **Genetics of early mammalian folliculogenesis.** *Cellular and*

Molecular Life Sciences, v. 63, n. 5, p. 579–590, 2006.

CONTI, Marco e colab. **Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>>.

CREE, Lynsey M. e colab. **A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes.** Nature Genetics, v. 40, n. 2, p. 249–254, 2008.

DADA, Laura A. e colab. **Hypoxia-induced endocytosis, of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC- ζ .** Journal of Clinical Investigation, v. 111, n. 7, p. 1057–1064, 2003.

DE VRIES, W N e colab. **Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes.** Genesis (New York, N.Y. : 2000), v. 26, n. 2, p. 110–2, Fev 2000.

DIANOV, Grigory L. e colab. **Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA.** Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, v. 68, n. February, p. 285–297, 2001.

DMITRIEVA, Natalia I. e MALIDE, Daniela e BURG, Maurice B. **Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA.** American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, v. 301, n. 3, p. 632–640, 2011.

EPPIG, John J. e colab. **Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity Between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport1.** Biology of Reproduction, v. 73, n. 2, p. 351–357, 2005.

FAIR, T. e colab. **Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles.** Molecular Reproduction and Development, v. 46, n. 2, p. 208–215, 1997.

FAIR, Trudee. **Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence.** Animal Reproduction Science, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 2003.

FUNG, Stephen e colab. **The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation.** Molecular Biology of the Cell, v. 24, n. 3, p. 184–193, 2013.

GABALDÓN, Toni e HUYNEN, Martijn A. **Shaping the mitochondrial proteome.** Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, v. 1659, n. 2–3, p. 212–220, 2004.

- GONDOS, Bernard e WESTERGAARD, Lars e BYSKOV, Anne Grete. **Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: Ultrastructural and squash preparation study.** American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 155, p. 189–195, 1986.
- HASSOLD, Terry e HUNT, Patricia. **Hassold200120human20aneuploidy.** Nature Genetics, v. 2, n. April, p. 280–291, 2001.
- HEYER, Wolf Dietrich e colab. **Rad54: The Swiss Army knife of homologous recombination?** Nucleic Acids Research, v. 34, n. 15, p. 4115–4125, 2006.
- HYTTEL, P e colab. **Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.** Science, v. 47, n. 96, p. 23–32, 1997.
- ITSARA, Leslie S. e colab. **Oxidative Stress Is Not a Major Contributor to Somatic Mitochondrial DNA Mutations.** PLoS Genetics, v. 10, n. 2, 2014.
- JACKSON, Stephen P. e BARTEK, Jiri. **The DNA-damage response in human biology and disease.** Nature, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>>.
- JAFFE, Laurinda A. e EGBERT, Jeremy R. **Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle.** Annual Review of Physiology, v. 79, n. 1, p. 237–260, 2017.
- JAZAYERI, Ali e colab. **Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity.** EMBO Journal, v. 27, n. 14, p. 1953–1962, 2008.
- KANG, Dongchon e HAMASAKI, Naotaka. **Alterations of Mitochondrial DNA in Common Diseases and Disease States: Aging, Neurodegeneration, Heart Failure, Diabetes and Cancer.** Current Medicinal Chemistry, v. 12, n. 4, p. 429–441, 2012.
- KIDDER, Gerald M. e VANDERHYDEN, Barbara C. **Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: Ensuring oocyte developmental competence.** Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v. 88, n. 4, p. 399–413, 2010.
- KIM, Kyeoung Hwa e colab. **The role of Rad51 in safeguarding mitochondrial activity during the meiotic cell cycle in mammalian oocytes.** Scientific Reports, v. 6, n. September, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep34110>>.
- KOVAL, Michael e MOLINA, Samuel A. e BURT, Janis M. **Mix and match: Investigating heteromeric and heterotypic gap junction channels in model systems and native tissues.** FEBS Letters, v. 588, n. 8, p. 1193–1204, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.025>>.

KRAYTSBERG, Yevgenya e colab. **Recombination of Human**. v. 304, n. May, p. 1–4, 2004.

KUJJO, Loro L. e colab. **Enhancing survival of mouse oocytes following chemotherapy or aging by targeting bax and Rad51**. PLoS ONE, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2010.

KUZNETSOV, Sergey e colab. **RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females**. Journal of Cell Biology, v. 176, n. 5, p. 581–592, 2007.

LAMARCHE, Brandon J. e ORAZIO, Nicole I. e WEITZMAN, Matthew D. **The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance**. FEBS Letters, v. 584, n. 17, p. 3682–3695, 2010.

LANE, Nick e MARTIN, William F. **The origin of membrane bioenergetics**. Cell, v. 151, n. 7, p. 1406–1416, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.050>>.

LENAZ, Giorgio. **Role of mitochondria in oxidative stress and ageing**. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, v. 1366, p. 53–67, 1998.

LI, Xuan e HEYER, Wolf Dietrich. **Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance**. Cell Research, v. 18, n. 1, p. 99–113, 2008.

LIM, D S e HASTY, P. **A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53**. Molecular and Cellular Biology, v. 16, n. 12, p. 7133–7143, 1996.

MA, Jun-yu e colab. **The repair of endo / exogenous DNA double-strand breaks and its effects on meiotic chromosome segregation in oocytes**. v. 28, n. 20, p. 3422–3430, 2019.

MACHADO, T. S. e MACABELLI, C. H. e SANGALLI, J.R. **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, p. 1–17, 2015.

MAHANEY, Brandi e MEEK, Katheryn e LEES-MILLER, Susan. **Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining**. Biochemical Journal, v. 417, p. 639–650, 2009.

MENCK, Carlos F M e MUNFORD, Veridiana. **DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?** Genetics and Molecular Biology, v. 37, n. 1 SUPPL. 1, p. 220–233, 2014.

MISHRA, Anup e SAXENA, Sneha e KAUSHAL, Anjali. **RAD51C/XRCC3 Facilitates Mitochondrial DNA Replication and Maintains Integrity of the Mitochondrial Genome**.

Molecular and Cellular Biology, v. 38, n. 3, p. 1–18, 2018.

MITCHELL, Petter. **Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.** . [S.l: s.n.]. , 1961

MORRIS, Joan K. e ALBERMAN, Eva. **Trends in Down's syndrome live births and antenatal diagnoses in England and Wales from 1989 to 2008: Analysis of data from the National Down Syndrome Cytogenetic Register.** BMJ (Online), v. 339, n. 7731, p. 1188, 2009.

MOYNAHAN, Mary Ellen. **The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans.** Oncogene, v. 21, p. 8994–9007, 2002.

NAGAOKA, So I. e HASSOLD, Terry J. e HUNT, Patricia A. **Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age- old problem.** Nature Genetics, v. 13, n. 7, p. 493–504, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

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

PAN, Hua e colab. **Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs.** Developmental Biology, v. 316, n. 2, p. 397–407, 2008.

PÂQUES, Frédéric e HABER, James E. **Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in Saccharomyces cerevisiae.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 63, n. 2, p. 349–404, 1999.

PELOSI, Emanuele e colab. **Dynamics of the Ovarian Reserve and Impact of Genetic and Epidemiological Factors on Age of Menopause.** Biology of Reproduction, v. 92, n. 5, p. 1–9, 2015.

PICTON, Helen e BRIGGS, David e GOSDEN, Roger. **The molecular basis of oocyte growth and development.** v. 145, p. 27–37, 1998.

POHJOISMÄKI, Jaakko L.O. e GOFFART, Steffi. **Of circles, forks and humanity: Topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA.** BioEssays, v. 33, n. 4, p. 290–299, 2011.

PRASAD, Shilpa e colab. **Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome.** Journal of Biomedical Science, v. 23, n. 1, p. 19–23, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>>.

RASSOOL, Feyruz Virgilia. **1-s2.0-S0304383502006924-main.pdf.** Cancer Letters, v. 193, p.

1–9, 2003.

SAGE, Jay M. e GILDEMEISTER, Otto S. e KNIGHT, Kendall L. **Discovery of a Novel Function for Human Rad51**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 25, p. 18984–18990, 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.099846>>.

SAGE, Jay M. e KNIGHT, Kendall L. **Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress**. *Mitochondrion*, v. 13, n. 4, p. 350–356, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2013.04.004>>.

SAN FILIPPO, Joseph e SUNG, Patrick e KLEIN, Hannah. **Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination**. *Annual Review of Biochemistry*, v. 77, n. 1, p. 229–257, 2008.

SANTOS, Teresa Almeida e EL SHOURBAGY, Shahy e ST. JOHN, Justin C. **Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome**. *Fertility and Sterility*, v. 85, n. 3, p. 584–591, 2006.

SATHANANTHAN, Henry e PERA, Martin e TROUNSON, Alan. **The fine structure of human embryonic stem cells**. *Reproductive biomedicine online*, v. 4, n. 1, p. 56–61, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61916-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61916-5)>.

SCHMIDT, L. e colab. **Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood**. *Human Reproduction Update*, v. 18, n. 1, p. 29–43, 2012.

SHILOH, Yosef. **The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape**. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, n. 7, p. 402–410, 2006.

SHOKOLENKO, Inna e colab. **Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA**. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 8, p. 2539–2548, 2009.

STEWART, Grant S. e colab. **The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder**. *Cell*, v. 99, n. 6, p. 577–587, 1999.

STUCKI, Manuel e colab. **MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks**. *Cell*, v. 123, n. 7, p. 1213–1226, 2005.

SU, You-Qiang e SUGIURA, Koji e EPPIG, John. **Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function: Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism**. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 27, n. 01, p. 032–042, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197803>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2742468>><<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1108008>>.

- SUNKARA, Sesh Kamal e colab. **Should androgen supplementation be used for poor ovarian response in IVF?** Human Reproduction, v. 27, n. 3, p. 637–640, 2012.
- THIBAUT, C. e SZÖLLÖSI, D. e GÉRARD, M. **Mammalian oocyte maturation.** Reproduction, nutrition, development, v. 27, n. 5, p. 865–896, 1987.
- TITUS, Shiny e colab. **Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans.** Science Translational Medicine, v. 5, n. 172, 2013.
- TSUZUKI, Teruhisa e colab. **Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 13, p. 6236–6240, 1996.
- VAN BLERKOM, Jonathan e DAVIS, Patrick e ALEXANDER, Samuel. **Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes.** Human Reproduction, v. 18, n. 11, p. 2429–2440, 2003.
- VAN DEN HURK, Robert e ZHAO, Jia. **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.** Theriogenology, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.
- VAN NOORD-ZAADSTRA, B M e colab. **Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy.** BMJ (Clinical research ed.), v. 302, p. 1361–5, 1991. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1670055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- WALLACE, Douglas C. **A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine.** Annual Review of Genetics, v. 39, n. 1, p. 359–407, 2005.
- WILDING, Martin e colab. **Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos.** Human Reproduction, v. 16, n. 5, p. 909–917, 2001.
- ZENG, Hai-Tao e colab. **Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes.** Biology of reproduction, v. 91, n. 2, p. 47, 2014.