



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

KATIANE TOSTES

**A AUTOFAGIA É NECESSÁRIA PARA A SEGREGAÇÃO DE DNA
MITOCONDRIAL NO FÍGADO**

SÃO CARLOS - SP

2021

KATIANE TOSTES

**A AUTOFAGIA É NECESSÁRIA PARA A SEGREGAÇÃO DE DNA
MITOCONDRIAL NO FÍGADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à
Universidade Federal de São Carlos como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti.

SÃO CARLOS - SP

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, em especial minha mãe Janilva Aparecida Tostes e minha irmã Maria Luiza Tostes Passos, por todo apoio emocional e por nunca deixarem de acreditar em mim e em meus sonhos.

Ao meu namorado, Fernando, por sempre apoiar e incentivar meu crescimento profissional. Obrigada pelas várias horas que foi paciente ao meu ouvir falar sobre a vida acadêmica e minhas inseguranças.

Aos amigos que surgiram durante essa longa jornada de graduação, em especial, Ideli, Marlon, Samuel e Isabelle. Obrigada por fazerem meus dias mais alegres, por serem meu apoio durante todos esses anos e por dividirem comigo momentos que vão muito além do que os estudos.

Às minhas amigas de apartamento, em especial, Letícia, Talita, Jéssica e Natália. Obrigada por se tornarem minha família longe de casa, vocês foram essenciais para que eu pudesse me adaptar a todas as mudanças e tornaram meus dias muito mais felizes.

Aos amigos de laboratório, em especial, Carol, Fabrícia, Djaci, Matheus, Rachel, Lindomar e Angélica, por mostrarem ser possível construir um ambiente de trabalho produtivo e amigável. Obrigada por todo aprendizado que compartilhamos, pelas horas de descontração e pelo carinho, vocês despertaram em mim o amor pela pesquisa.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Marcos Roberto Chiaratti, pela oportunidade e confiança na realização desse trabalho e pela paciência ao me ajudar a encontrar um projeto que me despertasse grande interesse.

À banca avaliadora, composta pelo Prof^o Dr^o Anderson Ferreira da Cunha e Prof^o Dr^o Felipe Roberti Teixeira.

Às agências de fomento FAPESP (processos 2017/05899-2 e 2018/20028-0), CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro e estrutural.

Aos diversos colaboradores do Departamento de Biotecnologia e Departamento de Genética e Evolução-UFSCar, pelo suporte até aqui.

Ao Profº Drº Julio C. B. Ferreira e o Drº Luiz R. G. Bechara do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por todo o apoio durante o projeto.

RESUMO

Mutações no genoma mitocondrial (mtDNA) são onipresentes em humanos e podem levar a um amplo espectro de doenças. No entanto, devido à presença de múltiplas moléculas de mtDNA na célula, a coexistência de mtDNAs mutantes e selvagens (denominada heteroplasmia) pode prevenir a manifestação de uma dada doença, desde que a porcentagem de moléculas mutantes não ultrapasse um limiar. Vale ressaltar, porém, que o nível de mtDNA mutante pode se alterar ao longo da vida dependendo do tecido e da mutação. Em particular, a segregação mitocondrial é bastante evidente em células hepáticas, as quais selecionam positivamente mutações no mtDNA, incluindo mutações não sinônimas. Usando camundongos nocautes para *Atg7* e heteroplasmáticos para um haplótipo mitocondrial selvagem e um deletério, mostramos que o fenótipo de acúmulo do mtDNA deletério no fígado é dependente de autofagia. O gene *Atg7* é uma enzima semelhante a E1, a qual atua ativando os dois sistemas de conjugação principais para o alongamento do autofagossomo, sendo que o seu nocaute resulta em bloqueio da autofagia. Por meio desse modelo experimental, propomos que o acúmulo idade-dependente de mtDNA mutante no fígado de indivíduos heteroplásmicos resulta da eliminação seletiva do mtDNA selvagem.

Palavras-chave: envelhecimento / fígado / mitocôndria / mtDNA / mutação / NZB.

ABSTRACT

Mutations in the mitochondrial genome (mtDNA) are ubiquitous in humans and can lead to a broad spectrum of disorders. However, due to the presence of multiple mtDNA molecules in the cell, coexistence of mutant and wild-type mtDNAs (termed heteroplasmy) can mask disease phenotype unless a threshold of mutant molecules is reached. Importantly, mutant mtDNA level can change across lifespan as mtDNA segregates in an allele- and tissue-specific fashion, potentially leading to disease. Mitochondrial segregation is most evident in hepatic cells, which positively select for mtDNA mutations, including mutations potentially affecting protein sequence. Using *Atg7* knockout and heteroplasmic mice with a deleterious mtDNA we show here that this phenotype relies on autophagy, implicating mtDNA degradation as a driving force of mtDNA segregation in the liver. The *Atg7* gene is an E1-like enzyme, responsible for activating the two main conjugation systems required for elongation of the autophagosome, and its knockout results in the block of autophagy. Based on this model, we suggest that the accumulation of age-dependent mutant mtDNA in the liver of heteroplasmic individuals is a consequence of the selective clearance of the alternative mtDNA variant.

Keywords: aging / liver / mitochondria / mtDNA / mutation / NZB

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dinâmica mitocondrial.....	5
Figura 2: Sistemas de conjugação do tipo ubiquitina.	6
Figura 3: Cruzamentos realizados para obtenção dos genótipos de interesse.	11
Figura 4: Deleção condicional do gene Atg7.....	17
Figura 5: Confirmação do nocaute fígado específico.....	18
Figura 6: O nível de DNA mitocondrial (mtDNA) NZB no fígado é dependente da expressão de Atg7.	19
Figura 7: O nível de DNA mitocondrial (mtDNA) NZB no fígado é dependente da expressão de Atg7.	20
Figura 8: O nocaute do Atg7 resulta em acúmulo de cópias de mtDNA no fígado.....	20
Figura 9: O nocaute do Atg7 resulta em estabilização do NZB no fígado de camundongos adultos.	21
Figura 10: O nocaute de Atg7 estabilizou o ganho de NZB no fígado.	22
Figura 11: O nocaute de Atg7 gerou queda no número de cópias de mtDNA no camundongo adulto.	23
Figura 12: Avaliação do conteúdo proteico de proteínas relacionadas a autofagia.	24
Figura 13: Proteínas relacionadas ao funcionamento mitocondrial.	25
Figura 14: Modelo hipotético que explica a segregação de mtDNA específica do fígado.....	29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de <i>primers</i> para genotipagem.....	12
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> para níveis de NZB.....	14
Tabela 3: Sequência de <i>primers</i> para número de cópias de mtDNA	14

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

Atg7^{-/-}: animal nocaute para o gene *Atg7*

ATP: adenosina trifosfato

BL6: camundongo C57BL/6J

CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

DP: desvio padrão

EROS: espécies reativas de oxigênio

mtDNA: DNA mitocondrial

nDNA: DNA nuclear

NZB: camundongo NZB/BINJ

Δ NZB: diferença do nível de NZB entre duas idades

MDVs: vesículas derivadas de mitocôndrias

OXPHOS: fosforilação oxidativa

P10: 10 dias de idade

P12: 12 dias de idade

P21: 21 dias de idade

P100: 100 dias de idade

PCR: reação em cadeia da polimerase

Primer F: *primer* senso

Primer R: *primer* anti-senso

qPCR: PCR quantitativa

SNPs: polimorfismos de nucleotídeo único

WB: western blotting

WT: animal selvagem

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais sobre as mitocôndrias	1
1.2. DNA mitocondrial e mutações	2
1.3. Dinâmica mitocondrial e autofagia	4
1.4. Modelo experimental	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Acasalamentos e manutenção dos animais	10
3.2. Genotipagens	12
3.3. Análise de heteroplasmia e número de cópias de mtDNA	13
3.4. Western blotting	14
3.5. Análise de dados	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Desde que foram descobertas há cerca de 30 anos, as mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) foram identificadas como uma das principais causas de doenças humanas (STEWART e CHINNERY, 2015). Tais mutações acometem principalmente tecidos que demandam grande aporte energético, culminando em casos com severidade que varia de média a letal (CHINNERY e HUDSON, 2013; LI et al., 2015; SCHON et al., 2012; WALLACE, 2010; WALLACE e CHALKIA, 2013). Além disso, praticamente todas as pessoas, incluindo indivíduos saudáveis, são portadoras de baixos níveis de mtDNA mutantes, os quais são transmitidos maternamente e podem se associar com doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer e tipos comuns de câncer (PAYNE et al. 2013). Esse quadro é agravado pela forte tendência que tecidos somáticos têm em acumularem mutações no mtDNA com o envelhecimento (LI et al., 2015; STEWART e CHINNERY, 2015). Em especial, essa característica é bastante pronunciada no tecido hepático onde observa-se maior acúmulo no mtDNA de mutações não sinônimas do que sinônimas (LI et al., 2015). Embora difícil de se explicar, o acúmulo de mutações pode estar associado a grande gama de processos metabólicos a que o fígado está sujeito, podendo resultar em danos ao mtDNA. Ademais, a renovação mitocondrial hepática é bastante rápida se comparada com outros tecidos (LI et al., 2015).

1.1. Considerações gerais sobre as mitocôndrias

Os primeiros registros sobre estruturas intracelulares que poderiam representar as mitocôndrias sugeriram em 1840 (ERNSETER e SCHATZ, 1981), durante a observação de células de fígado e rim. No entanto, foi somente em 1981 que Lynn Margulis teorizou a origem mitocondrial a partir da associação simbiótica de uma bactéria primitiva com uma célula procariótica, dando origem ao que se conhece atualmente como a sua estrutura e função (STEWART e CHINNERY, 2015). As mitocôndrias são principalmente conhecidas pelo papel que desempenham na respiração celular, onde ocorre a produção de adenosina trifosfato (ATP) através da

fosforilação oxidativa (OXPHOS) (SCHON et al., 2012; STEWART e CHINNERY, 2015; WALLACE, 2010). No entanto, as mitocôndrias também desempenham diversas outras funções de destaque como no catabolismo de ácidos graxos, na homeostase de cálcio e na regulação apoptótica (KÜHLBRANDT, 2015).

As mitocôndrias são consideradas organelas semiautônomas separadas do citoplasma por uma membrana externa e outra interna. A membrana externa é composta por porinas, as quais permitem a travessia de íons e pequenas moléculas de modo inespecífico, e por translocases que têm importante papel no transporte de proteínas. Por outro lado, a membrana interna é bastante impermeável, sendo o transporte de íons e proteínas realizado por proteínas específicas. Também estão presentes na membrana interna várias das proteínas necessárias para a OXPHOS. Por fim, o compartimento mais interno, delimitado pela membrana interna, é denominado de matriz mitocondrial. Este compartimento abriga enzimas envolvidas com a replicação e transcrição do mtDNA, a biossíntese de proteínas e várias outras reações enzimáticas (KÜHLBRANDT, 2015).

1.2. DNA mitocondrial e mutações

Diferente do DNA nuclear (nDNA), o mtDNA em mamíferos tem formato circular, extensão aproximada de 16,6 kb, é destituído de íntrons e quase não apresenta regiões intergênicas, motivo pelo qual 93% da sua sequência é composta por regiões codificantes de RNA (ANDERSON et al., 1981; LIGHTOWLERS et al., 2015; STEWART e CHINNERY, 2015; WALLACE, 2010). Dos 37 genes codificados pelo mtDNA, 13 são utilizados para a síntese de polipeptídeos constituintes da cadeia transportadora de elétrons, sendo os demais responsáveis por codificar 22 RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossomais (rRNAs). Estes tRNAs e rRNAs, além de proteínas codificadas pelo nDNA e importadas pela mitocôndria, são essenciais para a tradução intramitocondrial dos 13 RNAs mensageiros (mRNAs) codificados pelo mtDNA (STEWART e CHINNERY, 2015; WALLACE, 2010).

Cada célula abriga de centenas a milhares de cópias de mtDNA, sendo que o número de cópias de mtDNA é diretamente relacionado ao tipo celular e seu metabolismo (WALLACE, 2005). Tecidos com elevado requerimento energético

abrigam milhares de cópias de mtDNA por célula (STEWART e CHINNERY, 2015) e, por consequência, mtDNAs selvagens e mutantes podem coexistir numa mesma organela sem prejuízo para a função mitocondrial; condição denominada de heteroplasmia (STEWART e CHINNERY, 2015). Mutações no mtDNA podem surgir durante o desenvolvimento inicial, denominadas mutação *de novo*, ou serem herdadas maternalmente (WALLACE, 2018; CRAVEN et al, 2017). Mas vale ressaltar que os tecidos somáticos apresentam uma forte tendência de acúmulo de mutações no mtDNA com o envelhecimento (LI et al., 2015; STEWART e CHINNERY, 2015). Entretanto, as mutações precisam atingir um limiar tecido- e mutação- específico para o defeito bioquímico ou o fenótipo clínico se manifestar (WALLACE, 2018; STEWART e CHINNERY, 2015).

Segundo Lechuga-Vieco e colaboradores (2020), a segregação de mutações é um evento intracelular, em que cada célula possui capacidade de selecionar as mutações positiva ou negativamente, de acordo com a demanda do sistema OXPHOS. Sendo assim, em um tecido com diferentes tipos celulares pode haver células que selecionem para o haplótipo mutante e outras que selecionem para o selvagem, sendo a heteroplasmia do tecido definida pela somatória da seleção geral de cada tipo celular (LECHUGA-VIECO et al, 2020). Portanto, o acúmulo de mutações acontece independente da origem do nDNA (JENUTH et al., 1997), sendo específico para cada alelo ou tipo celular (BURGSTALLER et al, 2014; JENUTH et al, 1997; LECHUGA-VIECO et al, 2020; LIU et al, 1998; LI et al, 2015; SHARPLEY et al., 2012).

Doenças causadas por mutações no mtDNA afetam cerca de 1 em cada 5 mil pessoas (GORMAN et al., 2015; LIGHTOWLERS et al., 2015). No entanto, a alta densidade gênica torna o mtDNA bastante susceptível a mutações com possível efeito sobre a síntese de ATP (LIGHTOWLERS et al., 2015; MISHRA e CHAN, 2014; SCHON et al., 2012). Esses efeitos podem se originar de centenas de diferentes mutações pontuais ou deleções do genoma mitocondrial (WALLACE, 2018; CRAVEN et al, 2017). Sendo assim, a apresentação clínica dessas mutações varia bastante em fenótipo, mas comumente envolve o sistema nervoso central e periférico dada a grande demanda energética desses (CHINNERY e HUDSON, 2013; LI et al., 2015; NASSEH et al., 2001; SCHON et al., 2012; WALLACE, 2010; WALLACE e CHALKIA, 2013).

Embora mais comum para mutações na região de controle (displacement loop ou D-loop) do mtDNA, a qual é não codificante (WANG et al, 2001; MICHIKAWA

et al, 1999; NAUE et al, 2015; SAMUELS et al, 2013), a seleção positiva também abrange mutações em genes codificadores, inclusive mutações não-sinônimas com efeito deletério sobre a função proteica (LI et al, 2015, 2010). Neste contexto, têm-se descrito uma preferência dos hepatócitos pelo acúmulo de mutações não-sinônimas (LI et al, 2015). Este fenômeno é pouco compreendido, mas alguns trabalhos sugerem que o comprometimento da função mitocondrial possa ser vantajoso para o fígado (DE GREY, 1997; MORENO-LOSHUERTOS et al., 2006).

1.3. Dinâmica mitocondrial e autofagia

O termo dinâmica mitocondrial faz menção a várias características das mitocôndrias como arquitetura, atividade, transporte, interação com outras organelas, herança e degradação (CHEN e CHAN, 2017). Estes eventos são todos interconectados e dependentes de contínuos ciclos de fusão e fissão mitocondrial. Dada a distribuição das mitocôndrias no citoplasma, a fusão e fissão dessas organelas é essencial para homogeneizar o conteúdo das mesmas e garantir a função mitocondrial (MISHRA e CHAN, 2014). Por exemplo, mitocôndrias localizadas na região perinuclear importam com maior eficiência proteínas codificadas no núcleo e as distribuem para o restante da rede mitocondrial (KOWALD e KIRKWOOD, 2011). Da mesma forma, o acúmulo de danos a uma determinada mitocôndria é minimizado pela interação desta com outras mitocôndrias da rede mitocondrial, diluindo os danos (MISHRA e CHAN, 2014; TWIG et al., 2008; TWIG e SHIRIHAI, 2011).

Portanto, a dinâmica mitocondrial é essencial para garantir funções vitais da célula, além de desempenhar importante papel na regulação do metabolismo energético (MISHRA e CHAN, 2014). Os ciclos de fusão e fissão mitocondrial promovem o transporte mitocondrial, onde há mistura de proteínas, RNAs e DNAs, conhecido por complementação mitocondrial (CHEN, CHOMYN e CHAN, 2005), e eliminação de mitocôndrias danificadas e possivelmente daquelas portadoras de mtDNA mutantes (Figura 1). Neste contexto, mitocôndrias com baixo potencial de membrana ou que produzem muitas espécies reativas de oxigênio, por exemplo, parecem ser impedidas de reintegrarem a rede mitocondrial após fissão, sendo posteriormente eliminadas por autofagia (MISHRA e CHAN, 2016).

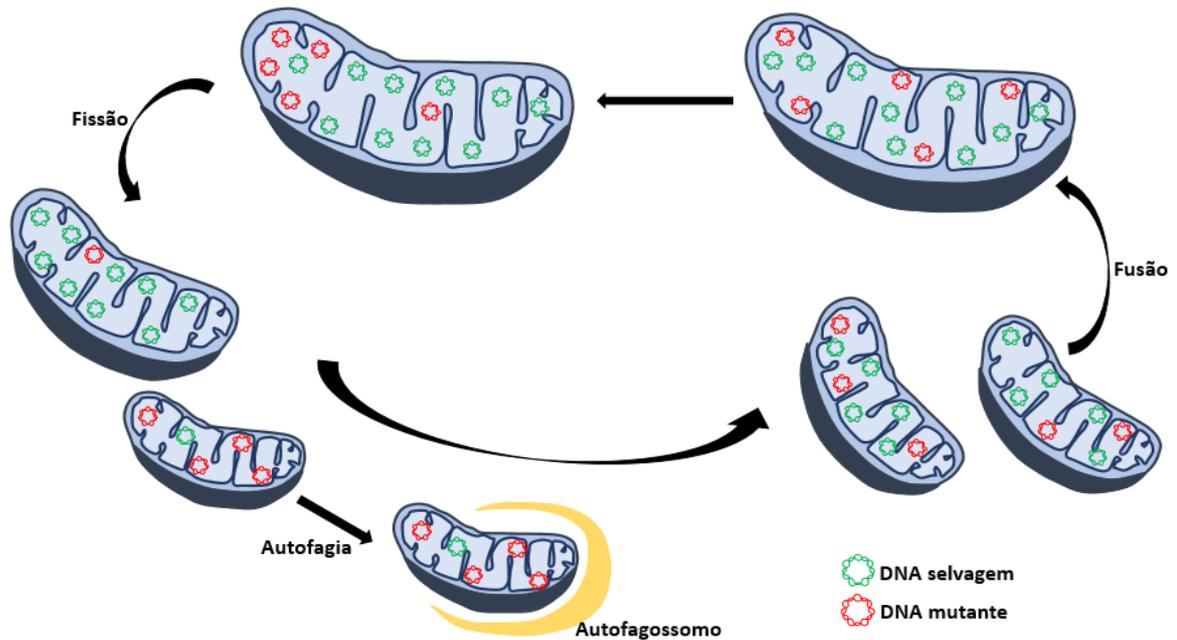


Figura 1: Dinâmica mitocondrial. Homogeneização do conteúdo de mtDNA e posterior eliminação, por autofagia, das mitocôndrias que atingiram o limiar de mutações. Elaborado pelo autor.

A autofagia constitui um mecanismo intracelular de degradação de componentes celulares, incluindo agregados proteicos e organelas, esses são então marcados com P62, que é uma proteína sinalizadora para degradação e posteriormente encaminhado para a autofagia (NODA e INAGAKI, 2015). Quando a autofagia é direcionada para a degradação específica de mitocôndrias ela é denominada mitofagia (GEISLER et al, 2010; NARENDRA et al, 2010; PICKLES et al, 2018). Apesar das suas várias formas de ocorrência, podendo ser mais ou menos seletiva, esta via de degradação caracteriza-se pela formação de uma estrutura com dupla membrana denominada autofagossomo (PICKLES et al., 2018). A função do autofagossomo é envelopar o conteúdo alvo, isolando-o do citoplasma, para posterior degradação nos lisossomos. Entretanto, para que ocorra a ativação da via autofágica é necessário a participação de várias proteínas conhecidas como ATG (KOMATSU et al., 2005).

O alongamento da membrana do autofagossomo envolve dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina, o ATG12 e o ATG8 (Figura 2). No primeiro, a proteína semelhante a ATG12 é conjugada à ATG5, de forma irreversível, pela ação de ATG7 e ATG10; estas últimas são proteínas semelhantes a enzimas E1 e E2 que

realizam o papel de ativação e conjugação, respectivamente. O complexo ATG12-ATG5 é posteriormente associado a proteína ATG16, formando um grande complexo associado à membrana de isolamento (NODA e INAGAKI, 2015). Já o sistema ATG8 começa a se formar a partir da exposição do resíduo de glicina presente no C-terminal da proteína ATG8, sendo tal ação mediada pela ATG4. Em seguida, a proteína ATG7 ativa a ATG8 e a direciona para ATG3, a qual é uma enzima semelhante a E2. O complexo ATG12-ATG5-ATG16 catalisa a ligação covalente entre ATG3 e o ATG8, já conjugado com o lipídeo fosfatidiletanolamina (PE), dando início ao alongamento do autofagossomo (BAEHRECKE 2005; KOMATSU et al., 2005). Diante disso, podemos concluir que o *Atg7* é um gene essencial para a formação do autofagossomo e sua deficiência hepática resulta no bloqueio da autofagia e consequente acúmulo de organelas anormais (por exemplo, mitocôndrias) e proteínas ubiquitinadas (KABEYA; MIZUSHIMA; YAMAMOTO; OSHITANI-OKAMOTO; OHSUMI; YOSHIMORI, 2004; KOMATSU et al., 2005; PICKLES; VIGIÉ; YOULE, 2018; TANIDA; TANIDA-MIYAKE; UENO; KOMINAMI, 2001).

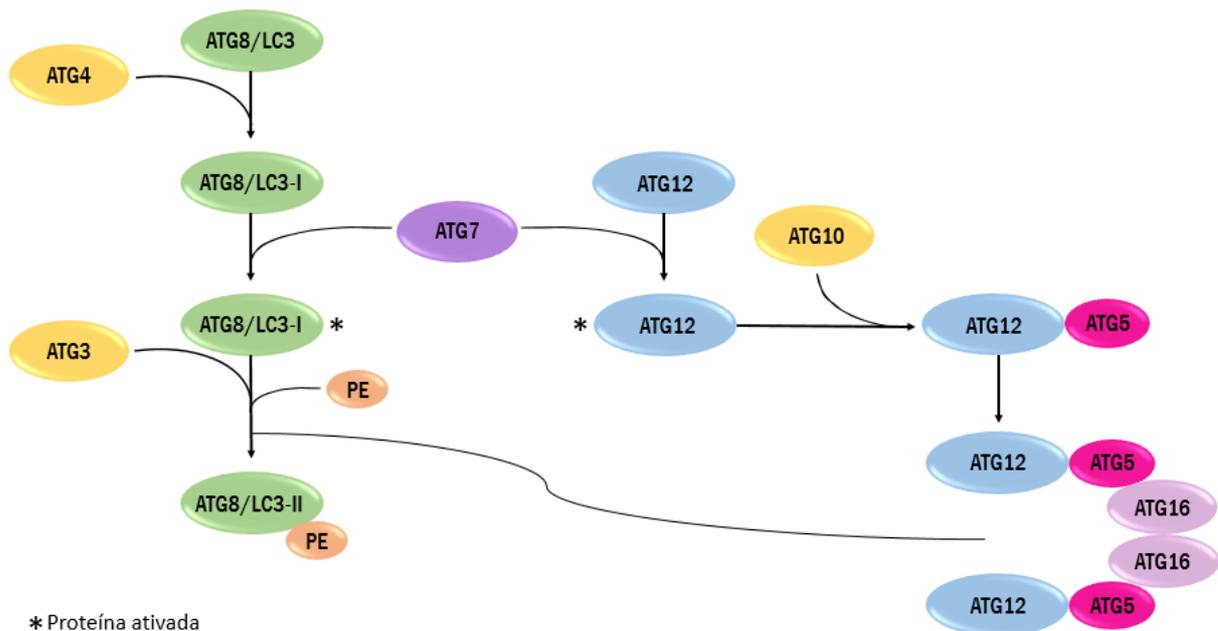


Figura 2: Sistemas de conjugação do tipo ubiquitina. Há dois principais sistemas para o alongamento da membrana do autofagossomo, o ATG8/ MAP1LC3A/B e o ATG12-ATG5-ATG16, em ambos a ATG7 possui função essencial. Adaptado de Genetics (1969).

Na autofagia, para que o autofagossomo inicie seu alongamento, é necessário que ocorra o recrutamento das proteínas ATG, mas no caso da mitofagia o responsável por esse recrutamento é o Parkin. O Parkin é uma ubiquitina ligase E3, da via PINK/Parkin relacionada a danos mitocondriais e considerada um importante marcador de disfunção mitocondrial (WHITWORTH e PALLANCK, 2009). Inicialmente, ocorre o recrutamento de Pink, uma quinase mitocondrial que é internalizada e posteriormente degradada, de acordo com o potencial de membrana. Quando ocorre uma queda no potencial de membrana há um bloqueio na internalização de Pink, a qual se acumula na membrana mitocondrial (MISHRA e CHAN, 2016). Tal acúmulo desencadeia o processo de mitofagia, através da importação da proteína Parkin presente no citosol, que se transloca para a membrana de mitocôndrias despolarizadas, levando à poli-ubiquitinação de várias proteínas da membrana mitocondrial, como por exemplo de TOMM20 (NARENDRA et al, 2008; NARENDRA et al, 2010; MATSUDA et al, 2010, QUIRÓS et al, 2015). A junção desses processos resulta na lipidação da LC3, importante proteína do sistema de conjugação do autofagossomo, e promove o reconhecimento da maquinaria autofágica, provocando a degradação específica da mitocôndria disfuncional (NARENDRA et al, 2008). Além disso, dados recentes apresentados por Christina e colaboradores (2021), demonstram outras vias alternativas de degradação mitocondrial. Segundo esse estudo, vesículas derivadas de mitocôndrias (MDVs) são capazes de entregar pedaços de mitocôndrias danificadas ao lisossomo, compensando a falta da autofagia, através de um processo dependente do mecanismo mediado por SNX9, uma proteína endocítica (nexina 9) (TOWERS et al, 2021).

1.4. Modelo experimental

A investigação do acúmulo de mutações mitocondriais pode ser realizada, por exemplo, por meio da utilização de camundongos heteroplásmicos contendo dois haplótipos de mtDNA, C57BL/6J e NZB/BINJ, doravante denominados de BL6 e NZB, respectivamente. O mtDNA NZB, quando comparado com BL6, difere em 91 nucleotídeos (MORENO-LOSHUERTOS et al., 2006) que resultam em defeitos mitocondriais e podem alterar o fenótipo cognitivo e comportamental dos animais (JOHNSON et al., 2001; ROUBERTOUX et al. 2003; SHARPLEY et al. 2012). Como

uma consequência provável, o mtDNA NZB exibe segregação tecido-específica em camundongos heteroplasmáticos (JENUTH et al, 1997; SHARPLEY et al, 2012; LECHUGA-VIECO et al, 2020; LATORRE-PELLICER et al, 2019; BATTERSBY, 2001; BATTERSBY et al, 2003; JOKINEN et al, 2015), muito semelhante ao padrão de segregação de variantes deletérias do mtDNA em camundongos e humanos (WEI et al, 2019; BURGSTALLER et al, 2014; LIU et al, 1998; LI et al, 2015; WANG et al, 2001; MICHIKAWA et al, 1999; NAUE et al, 2015; SAMUELS et al, 2013; LI et al, 2010).

Segundo Jenuth e colaboradores (1997), camundongos heteroplásmicos BL6/NZB apresentaram, com o envelhecimento, acúmulo bastante acentuado de mtDNA NZB no fígado e no rim, fornecendo fortes evidências de que a seleção celular desses tecidos, em sua maioria, é em favor do NZB, independente da origem do nDNA (JENUTH et al., 1997). No entanto, cada célula e tecido apresenta um tipo específico de comportamento. Por exemplo, células presentes em tecidos mitóticos como o hematopoiético e o baço selecionam negativamente o mtDNA NZB. Enquanto nas células de tecidos como o cérebro, pulmão, coração e músculo esquelético não parece ocorrer segregação; na verdade, observa-se que cerca de metade das células desses tecidos seleciona positivamente o NZB enquanto a outra metade seleciona positivamente o BL6 (JENUTH et al., 1997; SHARPLEY et al., 2012; LECHUGA-VIECO et al., 2020).

Com o intuito de investigar o acúmulo de mutações mitocondriais no fígado, nosso grupo construiu um modelo heteroplásmico BL6/NZB com nocaute condicional do gene *Atg7*. No presente trabalho, ao deletar condicionalmente o *Atg7*, investigamos a hipótese de que a autofagia seletiva de uma variante mitocondrial (e.g., mtDNA BL6) implica no acúmulo da variante alternativa (e.g., mtDNA NZB) no fígado.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral analisar o impacto do nocaute condicional do gene *Atg7* sobre o acúmulo hepático de mtDNA NZB em camundongos heteroplásmicos B6/NZB. Deste modo, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Comprovar o nocaute tecido-específico por genotipagem utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional e *primers* que amplificam o éxon 14 do *Atg7*,
- Confirmar a deficiência autofágica por análise do MAP1LC3A/B e SQSTM1 utilizando western blotting,
- Determinar a porcentagem de mtDNA NZB e o número total de cópias mtDNA no fígado e na cauda de animais selvagens e nocautes com 21 e 100 dias de idade,
- Determinar por western blotting proteínas relacionadas ao número de mitocôndrias/mtDNA (e.g., TOMM20, MT-CO1 e TFAM).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Acasalamentos e manutenção dos animais

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com os regulamentos e políticas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado de Animais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - protocolo nº 6923040220, 2629090919, 7788150318). Durante os cruzamentos iniciais, uma mutação de ocorrência espontânea no gene *Nnt* e presente na linhagem C57BL/6J (por exemplo, cepa *Alb-Cre*) foi eliminada com base em genotipagem e acasalamentos planejados (Ronchi et al, 2013). A obtenção das linhagens experimentais se deu através do cruzamento de fêmeas heteroplásmicas (contendo 30-50% de mtDNA NZB) e com genótipo *Atg7^{loxP/loxP}* com machos *Alb-cre^{+/+}* (Figura 3). Animais contendo os alelos *Atg7^{loxP}* (em que o éxon 14 do gene *Atg7* é flanqueado por sequências loxP) (KOMATSU et al, 2005) e *Alb-cre* (transgene que determina a expressão de CRE recombinase fígado-específica) (POSTIC et al, 1999) foram anteriormente descritos. Posteriormente, machos e fêmeas heteroplásmicos (30-50% mtDNA NZB) e com genótipo *Alb-cre^{+/-}·Atg7^{+/loxP}* foram acasalados entre si para obtenção dos animais para uso nos experimentos:

- Selvagem (WT): *Atg7⁺*
- Flanqueado (loxP): *Atg7^{loxP}*
- Nocaute (*Atg7^{-/-}*): *Atg7⁻*

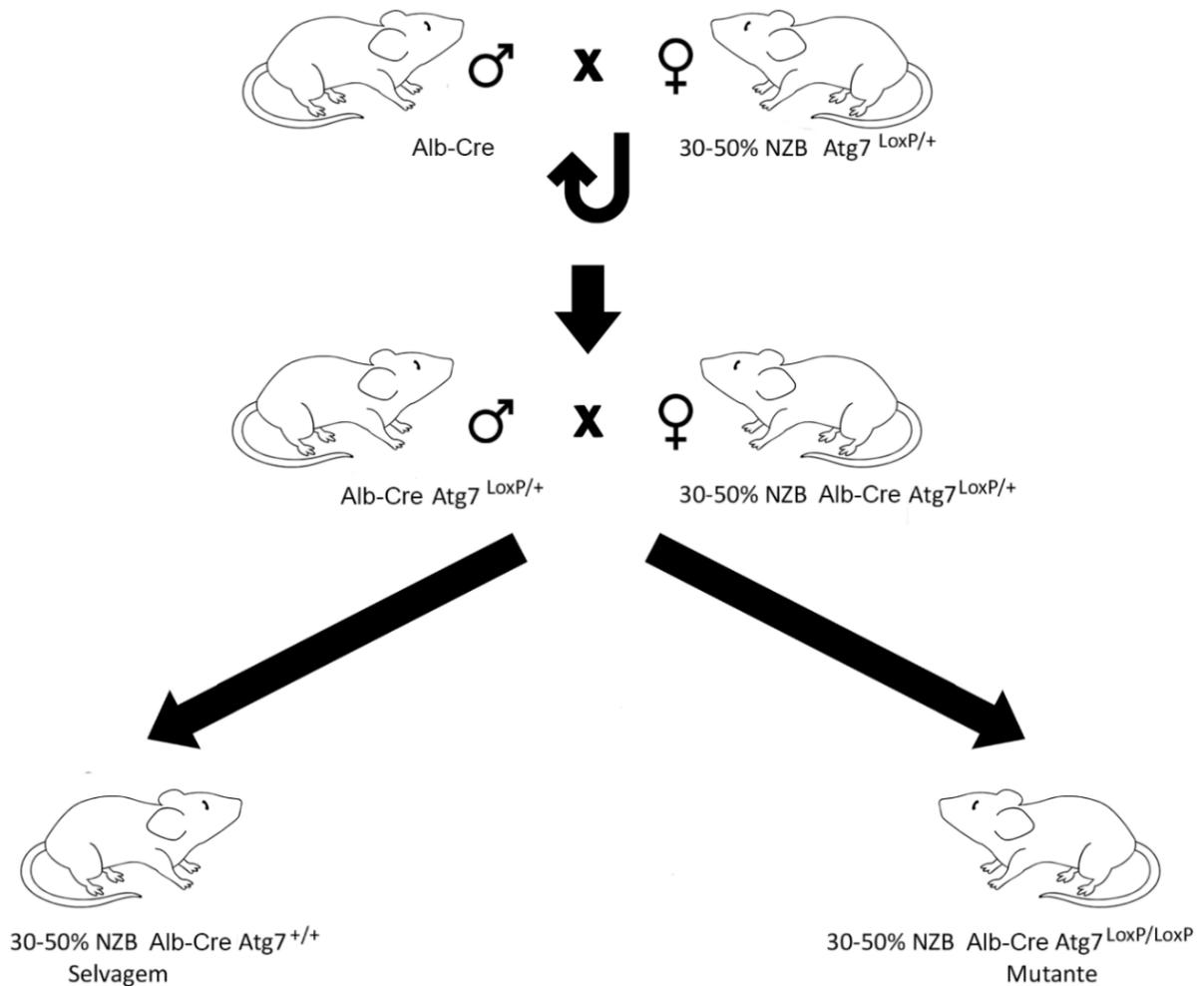


Figura 3: Cruzamentos realizados para obtenção dos genótipos de interesse. Obtenção dos dois grupos de interesse; WT: 30-50%NZB Alb-Cre Atg7^{+/+} e Atg7^{-/-}: 30-50%NZB Alb-Cre Atg7^{-/-}. Elaborado pelo autor.

A manutenção dos camundongos seguiu o *Guide for the Care and use of Laboratory Animals* (GARBER et al., 2011), sendo que os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração (PRESENCE RATOS e CAMUNDONGOS, Purina), e foram mantidos à 22°C em ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro (NAGY et al., 2003).

Todos os animais foram genotipados a partir de biópsia de orelha coletada 10-12 dias (P10-P12) após o nascimento, conforme descrito anteriormente (MACHADO et al, 2015; KOMATSU et al, 2005; POSTIC et al, 1999; CARVALHO et al, 2020). Com esta mesma idade também foi coletada uma biópsia da cauda. Para coleta de cauda, coração e fígado, os animais foram sacrificados com 21 ou 100 dias de idade (P21-P100). Todos os tecidos foram armazenados em criotubos de 2 mL e

imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas à -80°C, até o uso.

3.2. Genotipagens

A genotipagem inicial dos animais foi realizada a partir do DNA total isolado de biópsia auricular coletada 10-12 dias após o nascimento, conforme descrito previamente (MACHADO et al., 2015; THE JACKSON LABORATORY (stock No 3574)). Resumidamente, as amostras foram incubadas com 200 µL de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/mL proteinase K] por 3 h a 65°C. Ao final, as amostras foram incubadas por 20 min adicionais a 95°C para inativação da proteinase K e armazenadas a -20°C até o uso. As genotipagens de *Atg7* (loxP e excisado) e *Alb-Cre* foram realizadas por PCR convencional. As amostras previamente congeladas foram descongeladas e centrifugadas à 10000 x g por 5 min, e então diluídas 5 vezes em água. Aplicou-se em cada tubo de reação de PCR 5 µl da amostra diluída e 10 µl do mix de reação contendo 300nM dos *primers* F (senso) e R (*anti-senso*), 2,2 µl de água e 7,5 µl de JumpStart (Sigma-Aldrich). A sequência dos *primers* utilizados é apresentada na tabela abaixo. A PCR foi realizada considerando 30 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 3 s, 75°C por 63 s e 72°C por 5 min. Ao término, as amostras foram mantidas à 4°C e visualizadas após eletroforese em gel de agarose 2%, com o auxílio do corante Syber Safe (Sigma-Aldrich).

Gene alvo	Primer Senso	Primer Anti-senso
Atg 7 LoxP	TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT	CAGGACAGAGACCATCAGCTCCAC
Atg 7 Excisado	TCTCCCAAGACAAGACAGGGTGAA	AAGCCAAAGGAAACCAAGGGAGTG
Alb – Cre Controle Interno	ACGCGTTAATGGCTAATCGC	GGCGCTAAGGATGACTCTGG
Alb – Cre	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Tabela 1. Sequências dos *primers* senso e anti-senso utilizados na reação de PCR para genotipagem dos camundongos.

3.3. Análise de heteroplasmia e número de cópias de mtDNA

Para análise da cauda, coração e fígado, foram utilizados 22 animais do grupo controle (13 com 21 dias e 9 com 100 dias) e 24 animais do grupo nocaute (15 com 21 dias e 9 com 100 dias), o DNA total foi extraído utilizando protocolo a base de fenol-clorofórmio, conforme previamente descrito por Machado e colaboradores (2015). Resumidamente, os diferentes tecidos foram digeridos *overnight* à 55°C em 500 µL de solução de digestão SNET [0,4 M NaCL, 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 M EDTA (pH 8,0), SDS 20% e 0,4 mg/mL proteinase K]. A proteína foi removida por tratamento com solução contendo 25:24:1 de fenol (P4557 Sigma), clorofórmio (QHC028 QHEMIS) e álcool isoamílico (A1074.01-BJ Synth), agitada por 30 minutos e posteriormente centrifugada a 14000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico e a centrifugação anterior repetida. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol 100% (1.093.4.1000 Merck), centrifugação a 13000 x g por 15 minutos em temperatura de 4°C. A lavagem foi realizada com etanol 70% (Sigma-Aldrich), seguida de centrifugação a 13000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente, e a eluição em água ultrapura (ThermoFisher Scientific).

Os níveis de mtDNA NZB e B6 foram determinados por amplificação no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) seguindo o descrito por Machado et al. 2015. Para cada amostra, foram realizadas triplicatas com volume de 15 µl contendo 0,2 µM de *primers*, 1x LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich) e 1 ng de DNA total. Para tal, foram usados os *primers* ARMS22 e MT20 (que amplificam um fragmento de 118 pb específico do mtDNA NZB) e os *primers* ARMS2 e MT14 (que amplificam um fragmento de 146 pb específico do mtDNA B6) (Tabela 2). Os níveis de cada haplótipo foram comparados em cada amostra considerando-se a fase exponencial de amplificação. A porcentagem de mtDNA NZB foi determinada em relação à soma das quantidades de mtDNA NZB e B6. As reações de amplificação foram conduzidas por 40 ciclos de 95°C durante 10 min, 95°C por 15 s e 62°C por 1 min. A sequência dos *primers* utilizados segue na tabela abaixo.

Gene alvo	Primer Senso	Primer Anti-senso
ARMS 2/14	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGTC
ARMS 20/22	TGGCACTCCCGCTGTAAAAA	TTATCCACGCTTCCGTTACGTC

Tabela 2. Sequências dos *primers* senso e anti-senso utilizados na reação de qPCR (PCR quantitativo) para calcular o nível de NZB presentes nos diferentes tecidos.

A quantidade total de cópias de mtDNA por célula também foi determinada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System, como descrito por Machado e colaboradores (2015). O número total de cópias de mtDNA por célula foi determinado por amplificação paralela de qPCR de um fragmento de mtDNA, parte de *mt-Nd1*, através do *primer mt-Nd1* (Tabela 3), juntamente à amplificação do gene nuclear de cópia única *Apob*, o qual foi empregado para normalização do número de cópias de mtDNA por célula (Tabela 3), considerando que duas cópias do gene *Apob* estão presentes por célula (MACHADO et al., 2015). As quantificações utilizando o *primer mt-Nd1* foram realizadas em triplicatas e nas mesmas concentrações utilizadas para medir o nível de mutações. Enquanto, quantificações com o normalizador nuclear, que também foram realizadas em triplicatas, continham 0,2 µM de *primers*, 1x LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich) e 1 ng de DNA total.

Gene Alvo	Primer Senso	Primer Anti-senso
<i>mt-Nd1</i>	TCCGAGCATCTTATCCACGC	GTATGGTGGTACTCCCGCTG
<i>Apob</i>	CACGTGGGCTCCAGCATT	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG

Tabela 3. Sequências dos *primers* senso e anti-senso utilizados na reação de qPCR para quantificar o número de cópias de mtDNA presente nos diferentes tecidos.

3.4. Western blotting

Os níveis das proteínas alvo foram analisados por western blotting utilizando lisado hepático de camundongos P21 e P100, foram utilizados 14 animais do grupo controle (7 com 21 dias e 7 com 100 dias) e 14 animais do grupo nocaute (7 com 21 dias e 7 com 100 dias), como descrito em Campos e colaboradores (2017). A homogeneização do tecido foi realizada com auxílio de pestilo na presença de 1:3

(relação massa:volume) de tampão contendo 5µl de inibidor de protease para cada 1 mg de tecido, 210 mM de manitol, 70 mM de sacarose, 5 mM de MOPS e 1 mM de EDTA (pH 7.4). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 22000 x g por 5 min e temperatura de 4°C. Após recuperação do sobrenadante este foi utilizado para determinação da concentração proteica pela técnica de Bradford. A curva de Bradford foi realizada com albumina bovina a 1mg/ml, nas diferentes proporções: 0µl de albumina:20µl de água, 1µl de albumina:19µl de água, 3µl de albumina:17µl de água, 5µl de albumina:15µl de água, 7µl de albumina:13µl de água, 10µl de albumina:10µl de água. Finalmente, a concentração proteica foi ajustada para 3 mg/ml por adição de água e tampão de amostra 5x (SDS, glicerol, bromofenol, 1 M Tris-Cl [pH 6,8] e b-mercaptoetanol), seguido de aquecimento à 95°C por 5 min.

As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE (15%) para separação das proteínas por eletroforese. A corrida foi realizada a 120 V por 1 h. Após, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF através do sistema de transferência Mini Trans-Blot Cell (BioRad, a 110V por 1 h 15). A transferência das proteínas foi confirmada por coloração da membrana com solução PONCEAU, seguido de bloqueio por 2 h em solução TTBS (10 mM Tris-CL [pH 7,6], 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA). Após incubação overnight da membrana com o anticorpo primário 1:1000 (anti-MAP1LC3A/B (4108S, Cell Signaling Technology), -SQSTM1 (5114S, Cell Signaling Technology), -TOMM20 (sc-11415, Santa Cruz Biotechnology), -TFAM (SAB1401383, Sigma Aldrich), -MT-CO1 (ab14705, Abcam) e -GAPDH (2-RGM2, Advanced Immunochemical)), a mesma foi lavada em solução TTBS (3 vezes de 5 min cada) e incubada por 2 h com anticorpo secundário 1:3000 (reativo a espécie em que o anticorpo primário foi produzido, anti-camundongo IgG-HRP (KPL), anti-coelho IgG-HRP (KPL)) conjugado a peroxidase. Finalmente, a membrana foi lavada em solução TTBS (3 vezes de 5 min cada), revelada com reagente ECL prime (GE) e analisada por bioluminescência. Os níveis de cada proteína foram determinados utilizando o ImageJ (NIH) e são apresentados, após normalização pelo GAPDH, em relação ao grupo controle WT.

3.5. Análise de dados

O nível de mtDNA NZB em um dado momento e tecido (e.g., fígado no P21 ou P100) foi normalizado (subtração) pelo nível de mtDNA NZB na cauda do mesmo animal e coletado de modo contemporâneo (e.g., P21 ou P100) ou anteriormente (e.g., P10). Esta diferença é expressa nos resultados abaixo como delta NZB, sendo utilizada para correção dos valores iniciais de mtDNA NZB no animal (SHARPLEY et al, 2012). Trabalhos anteriores mostraram que os níveis de mtDNA NZB na cauda se mantêm estáveis ao longo da vida do animal, possibilitando o uso da cauda com esse propósito (JENUTH et al, 1997; BATTERSBY et al, 2003; SHARPLEY et al, 2012; LECHUGA-VIECO et al, 2020). Alternativamente, o delta NZB transformado (h') foi calculado como proposto por Johnston e Jones (2016): $h' = \ln(h / (h_0 - 1) / h_0 (h - 1))$, onde h é o valor NZB (proporção) em um determinado tecido e idade (e.g., fígado no P21 ou P100), enquanto h_0 é o valor NZB inicial (proporção) estimado com base na cauda (e.g., P10). A correção considerando o delta NZB transformado é considerada mais robusta do que o delta NZB, permitindo a comparação de camundongos com diferentes valores iniciais de mtDNA NZB. Valores positivos de h' indicam aumento dos níveis de mtDNA NZB em relação a h_0 .

A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS University Edition v. 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA). Os dados foram testados quanto à distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e transformados quando necessário. Os valores de NZB, delta NZB, delta NZB transformado e número de cópias de mtDNA foram comparados entre os grupos (WT vs. *Atg7^{-/-}*) e idades (P21 vs. P100) por meio de teste *t*-Student não pareado. Os níveis de proteína foram comparados entre grupos e idades por ANOVA de dois fatores, seguido do teste de comparação de médias de Tukey. Diferenças com probabilidades (P) < 0,05 foram consideradas significativas. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS

Para investigar um possível papel da autofagia no fenótipo hepático, deletamos condicionalmente o gene *Atg7* (Figura 4), através da excisão do éxon 14, cruzando fêmeas heteroplasmáticas BL6/NZB (Machado et al, 2015) com machos *Atg7*-floxed (KOMATSU et al, 2005) e *Alb*-Cre (POSTIC et al, 1999).

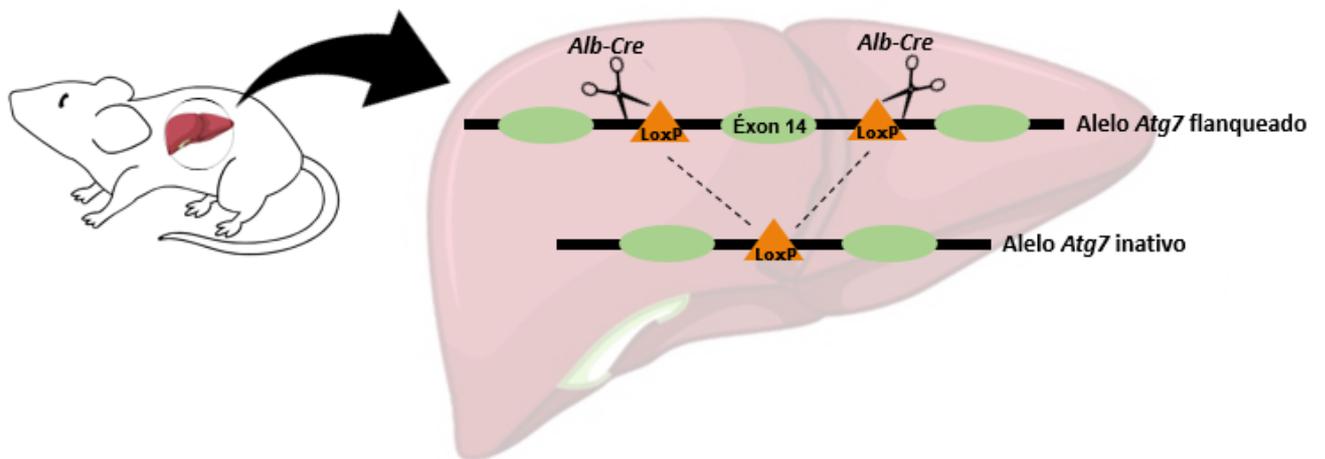


Figura 4: Deleção condicional do gene *Atg7*. Utilizando o sistema Cre-loxP com ativação específica em fígado, através do gene *Alb*, foi possível deletar o éxon 14 do gene *Atg7*, tornando-o inativo nesse tecido. Elaborado pelo autor.

A fim de confirmar a excisão do éxon 14 do gene *Atg7* e comprovar a eficiência do nocaute, foram genotipadas amostras de cauda, fígado, rim, baço e coração dos camundongos pertencentes aos grupos selvagens (WT) e nocaute (*Atg7*^{-/-}) (Figura 5). As análises foram realizadas em duas etapas: na primeira (Figura 5A), observamos que, independentemente do tecido analisado, os animais WT apresentaram bandas amplificadas com ~200 pb (indicativo da forma selvagem do alelo *Atg7*), enquanto os animais *Atg7*^{-/-}, apresentaram bandas entre 500 e 600 pb (indicativo do alelo *Atg7*-floxed); a segunda parte consistiu em analisar a deleção do éxon 14 nos diferentes tecidos (Figura 5B). Nessa etapa podemos observar que todas as amostras do grupo WT apresentaram bandas maiores que 1000 pb (indicativo da forma selvagem do alelo *Atg7*), enquanto nas amostras *Atg7*^{-/-} notamos que apenas a amostra de fígado apresentou uma banda na altura de ~600 pb (indicativo da versão recombinada do alelo *Atg7*-floxed, ou seja, deletado para o éxon 14).

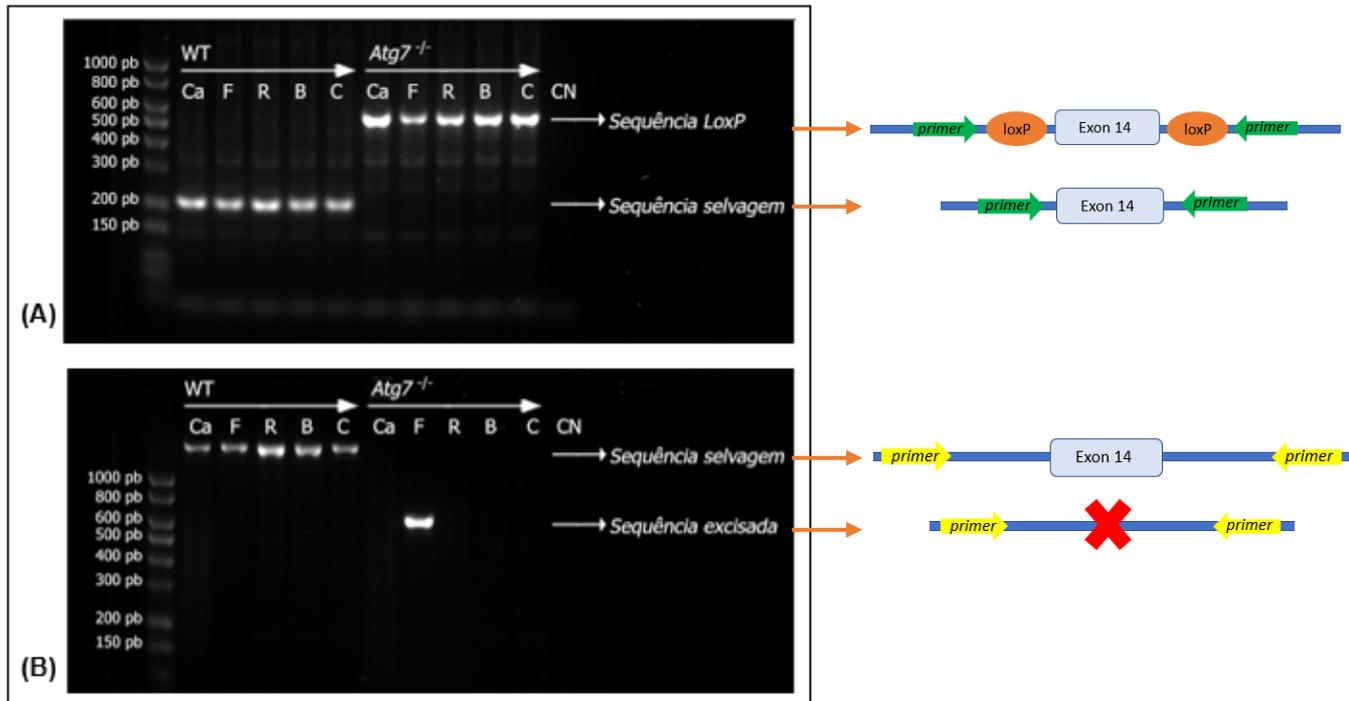


Figura 5: Confirmação do nocaute fígado específico. Análises de cauda (Ca), fígado (F), rim (R), baço (B) e coração (C) de camundongos com 100 dias de idade. (A) A presença de sítios loxP flanqueando o éxon 14 do gene *Atg7* resulta em um fragmento de ~ 550 pb (sequência floxed). (B) A expressão de Cre recombinase leva à recombinação de locais loxP e excisão do éxon 14, que é detectado como um fragmento de ~ 600 pb apenas no fígado de camundongos *Atg7*^{-/-} (sequência excisada); no grupo WT, um fragmento > 1000 pb é observado (sequência de tipo selvagem). CN = controle negativo.

Após a confirmação do nocaute tecido-específico, o impacto do bloqueio da autofagia sobre os níveis de mtDNA NZB foram acessados, por qPCR, no fígado e na cauda dos animais ao atingirem 21 dias de idade (P21). O bloqueio da autofagia no fígado desencadeou uma alteração no padrão de segregação comparado com animais WT (Figura 6A). As caudas P21 apresentaram segregação neutra como indicado por níveis similares ($P=0,57$) de NZB entre os grupos WT (33,9%) e *Atg7*^{-/-} (31,7%), e também pelo cálculo do delta NZB (Figura 6B). Por outro lado, o delta NZB no fígado foi maior em animais WT do que nos *Atg7*^{-/-} (Figura 6C), consequentemente resultando em maiores níveis de NZB no fígado dos animais WT (43,8%) em relação aos *Atg7*^{-/-} (33,3%; $P = 0,01$). Vale salientar que os níveis de mtDNA NZB nos diferentes tecidos foram normalizados através do cálculo do delta NZB pelos valores encontrados na cauda, como sugerido por relatos prévios (JENUTH et al. 1997 e SHARPLEY et al. 2012).

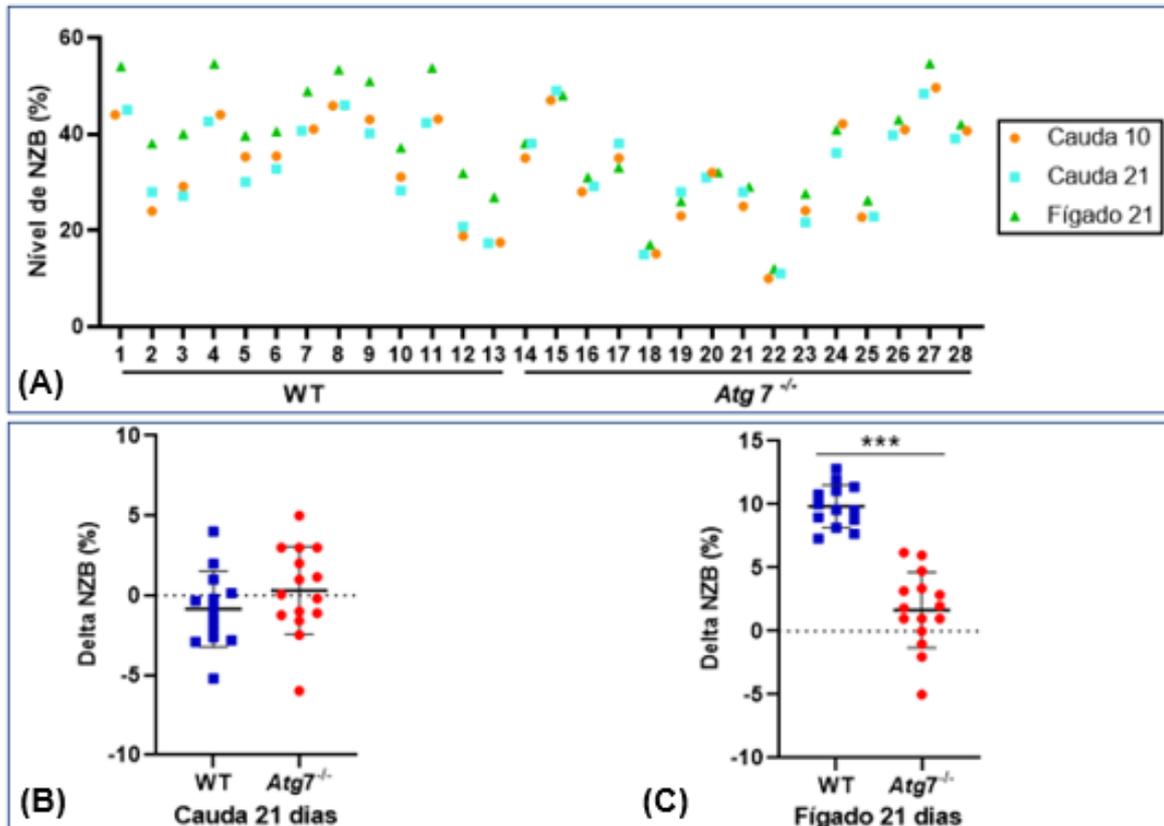


Figura 6: O nível de DNA mitocondrial (mtDNA) NZB no fígado é dependente da expressão de *Atg7*. Para as análises de 21 dias foram utilizados 13 animais para o grupo WT e 15 animais para o grupo *Atg7*^{-/-}. (A) O nocaute de *Atg7*^{-/-} aos 21 dias resultou na estabilização dos níveis de mtDNA NZB no fígado. As caudas também não apresentaram diferença significativa entre os grupos (B). Enquanto no fígado, o nível de NZB foi maior no grupo WT (C). Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado $P < 0,05$ como significativo.

O delta NZB transformado é considerado uma análise mais robusta do que o delta NZB, possibilitando comparar até mesmo animais com valores inicialmente bastante distintos de NZB na cauda, pois avalia os níveis de NZB dependente do valor inicial; valores positivos de delta NZB transformado indicam aumentam no nível de NZB, enquanto valores negativos indicam perda. Os valores transformados confirmaram os resultados encontrados por meio do cálculo do delta NZB. Em resumo, a segregação do mtDNA na cauda apresentou-se neutra tanto em camundongos WT quanto em *Atg7*^{-/-} (Figura 7A). Porém, diferente do acúmulo de mtDNA NZB observado no fígado do grupo WT (0,44), o nível de mtDNA se mantém estável no fígado do grupo *Atg7*^{-/-} (0,08) (Figura 7B).

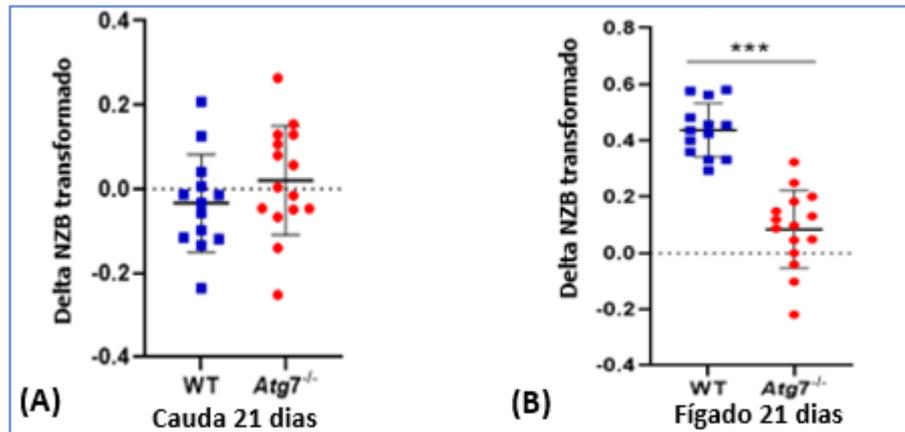


Figura 7: O nível de DNA mitocondrial (mtDNA) NZB no fígado é dependente da expressão de *Atg7*. A transformação dos valores NZB comprovaram que a cauda possui segregação neutra, independentemente do grupo (A). Enquanto no fígado, visualizamos um ganho de NZB no grupo WT, mas não no *Atg7*^{-/-} (B). Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado P < 0,05 como significativo.

Buscando aprofundar nosso entendimento sobre os efeitos descritos acima, calculamos o número total de cópias de mtDNA. Como resultado, observamos um aumento significativo do número de cópias de mtDNA no fígado de animais *Atg7*^{-/-} em relação aos WT no P21 (P = 0,0001, Figura 8A). Em comparação, o número de cópias de mtDNA entre os grupos, quando considerada a análise na cauda, manteve-se similar (Figura 8B). É importante destacar que a análise do número de cópias no fígado, quando considerada a contribuição de cada genótipo, indicou aumento do mtDNA BL6, nos animais *Atg7*^{-/-}, mas não do NZB (Figura 8C).

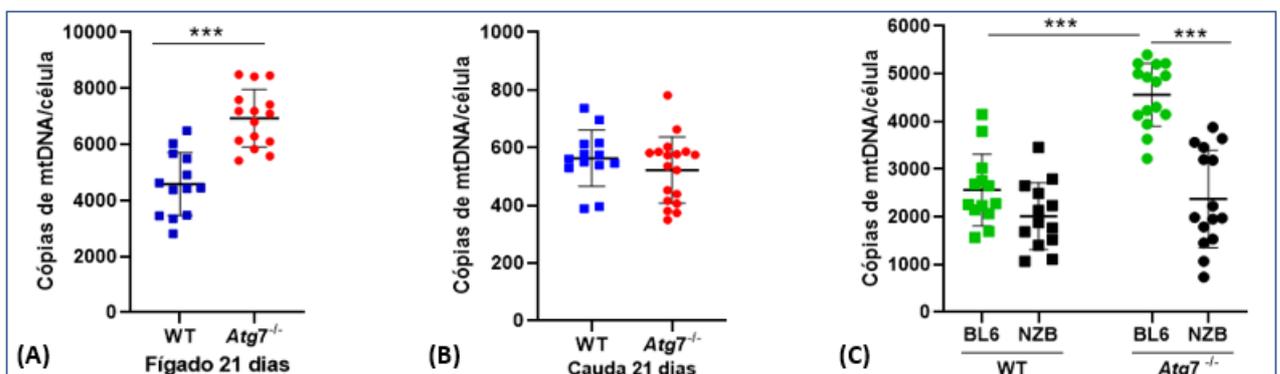


Figura 8: O nocaute do *Atg7* resulta em acúmulo de cópias de mtDNA no fígado. Para as análises de número e cópias de mtDNA com 21 dias foram utilizados 13 animais para o grupo WT e 15 animais para o grupo *Atg7*^{-/-}. O grupo *Atg7*^{-/-} apresentou maior número total de cópias de mtDNA no fígado aos 21 dias (A), mas não apresentou diferença entre as caudas. Os níveis de BL6 estão aumentados no grupo *Atg7*^{-/-}. Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado P < 0,05 como significativo.

Em seguida, para investigar se o fenótipo encontrado nos animais P21 sofria alterações durante o envelhecimento, analisamos um grupo de camundongos adultos, com 100 dias (P100). Ao analisarmos o fígado desses animais encontramos que o grupo *Atg7*^{-/-} apresentou o mesmo padrão observado no grupo P21, com o acúmulo de NZB praticamente nulo quando comparado ao grupo WT (Figura 9A). Por outro lado, o grupo WT apresentou no mesmo período um ganho substancial de NZB no fígado (delta NZB igual a ~25%, Figura 9B). Também confirmamos que o nocaute do gene *Atg7*^{-/-} no fígado de animais P100 não causou impacto sobre o nível de mtDNA NZB na cauda (Figura 9C) e no coração (Figura 9D), em comparação com a cauda no P10.

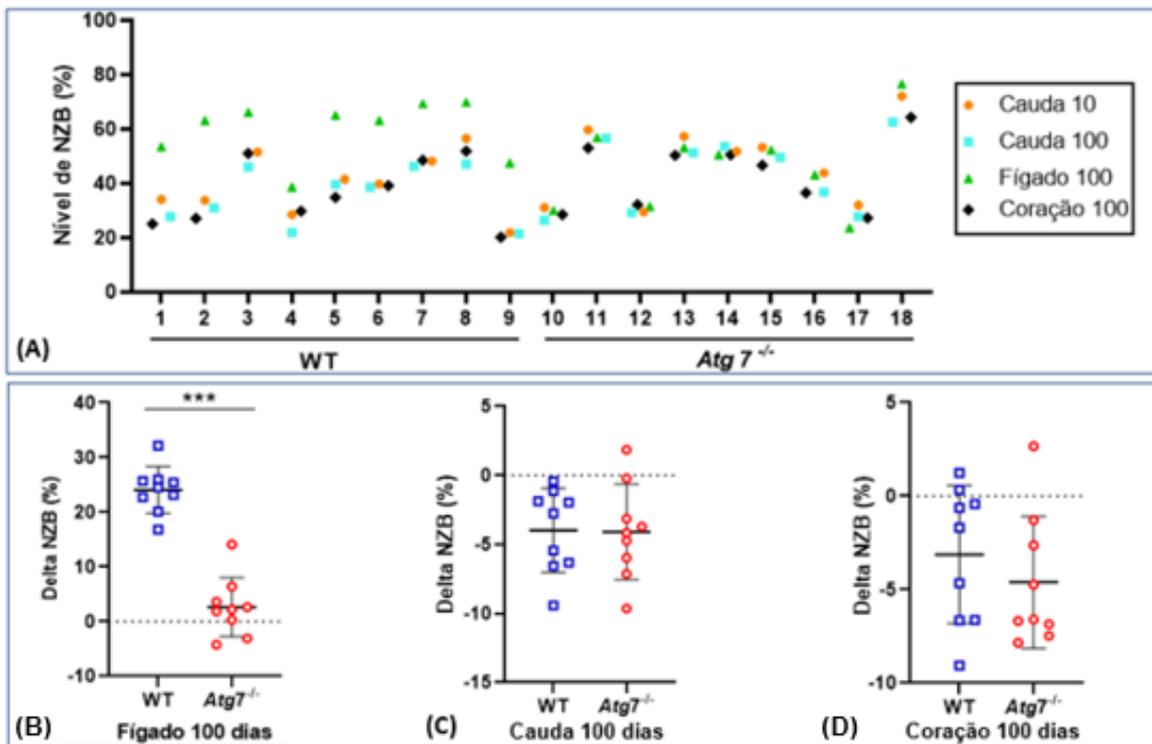


Figura 9: O nocaute do *Atg7* resulta em estabilização do NZB no fígado de camundongos adultos. Para as análises de níveis de mtDNA NZB, após 100 dias, foram utilizados 9 animais para o grupo WT e 9 animais para o grupo *Atg7*^{-/-}. Os níveis de NZB no fígado dos animais do grupo *Atg7*^{-/-}, representados pelo triângulo, permaneceram estáveis (A). Os níveis de NZB presentes no fígado do grupo WT foram ainda maiores do que os vistos em P21, para o mesmo grupo (B). O nocaute também não afetou os níveis de NZB presentes na cauda (C) e no coração (D) com 100 dias. Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado $P < 0,05$ como significativo.

Para visualizar de maneira mais clara o nível de NZB no camundongo adulto, comparamos cada grupo com o delta NZB transformado de P21 e P100. Ao analisar o fígado dos animais P100, notamos um acúmulo substancial no nível de

mtDNA NZB no grupo WT, mas não no *Atg7*^{-/-} (Figura 10A). Já, ao comparar os valores dentro de cada grupo após 100 dias, observamos que o delta NZB transformado nos fígados WT variaram de 0,4 (P21) para 1,0 (P100; Figura 10B), enquanto para os animais *Atg7*^{-/-} a variação permaneceu próxima de zero (Figura 10C).

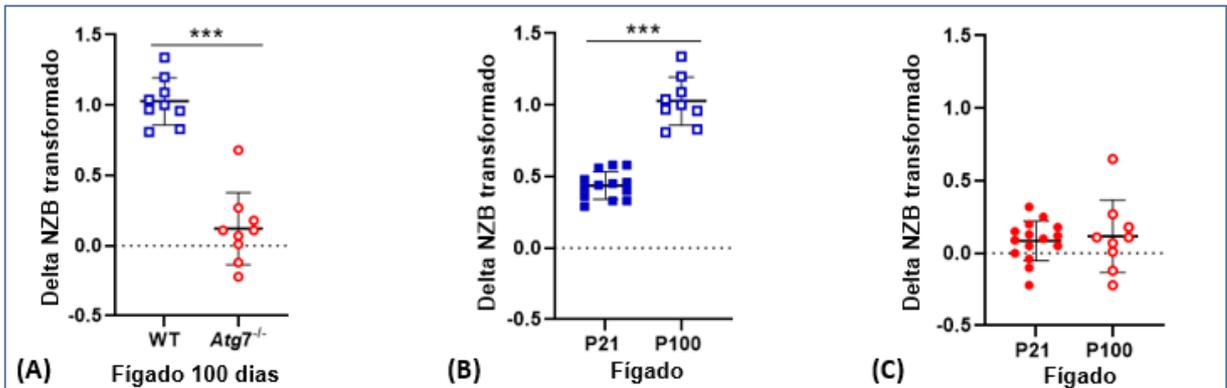


Figura 10: O nocaute de *Atg7* estabilizou o ganho de NZB no fígado. Os níveis de NZB foram significativamente maiores no fígado do grupo WT (A). Quando comparamos esses parâmetros nos dois pontos de checagem, P21 e P100, notamos que o grupo WT sofreu acúmulo de NZB já nos primeiros 21 dias, mas no camundongo adulto (P100), tal acúmulo tornou-se ainda mais significativo (B). Enquanto o grupo *Atg7*^{-/-}, permaneceu com a variação no nível de NZB praticamente nula (C). Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado $P < 0,05$ como significativo.

Em contraste com o acúmulo de mtDNA em P21 (Figura 6A), o número total de cópias de mtDNA no P100 foi menor no fígado *Atg7*^{-/-} do que no WT (4.491 vs 5.801, respectivamente; Figura 11A). Quando analisamos o número de cópias de mtDNA por grupo podemos traçar dois fenótipos: o primeiro é o aumento no número de cópias de mtDNA no grupo WT ao se comparar fígados P21 e P100 (Figura 11B); já o segundo fenótipo pode ser visto no grupo *Atg7*^{-/-}, onde se observa um aumento no número de cópias de mtDNA em fígado P21, seguido de redução no P100 (Figura 11C).

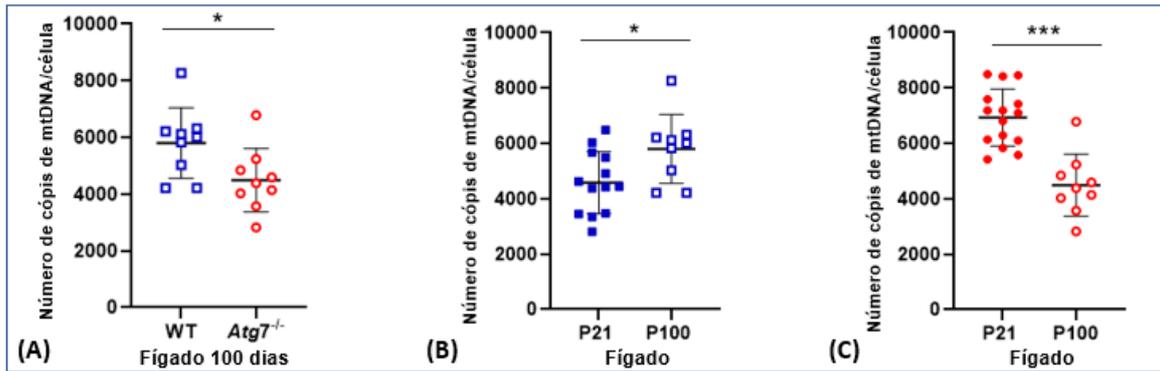


Figura 11: O nocaute de *Atg7* gerou queda no número de cópias de mtDNA no camundongo adulto. O número de cópias de mtDNA foram significativamente maiores no fígado do grupo WT (A). Quando comparamos esses parâmetros nos dois pontos de checagem, P21 e P100, notamos que o grupo WT sofreu acúmulo de cópias no fígado de camundongos adultos (P100) (B). Enquanto o grupo *Atg7*^{-/-}, diminuiu o número de cópias (C). Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado $P < 0,05$ como significativo.

Para obter mais informações sobre os mecanismos associados à segregação de mtDNA, avaliamos os níveis de diferentes proteínas no fígado dos animais P21 e P100 (Figura 12A e B, respectivamente) através da técnica de Western Blotting. Entre elas temos as proteínas MAP1LC3A/B I (LC3 - I) e MAP1LC3A/B II (LC3 - II), as quais são consideradas marcadores padrões de autofagossomos. Também realizamos a mensuração de P62/SQSTM-1 (P62), por seu importante papel como receptora de autofagia (RUNWAL; STAMATAKOU; SIDDIQI; PURI; ZHU e RUBINSZTEIN, 2019); de TOMM20, por se tratar de um receptor essencial para proteínas direcionadas à mitocôndria (PARK; LEE; CHOI; JOUNG; YOON e KIM, 2019); de TFAM, por estar envolvido na regulação da transcrição e replicação do mtDNA (KANG; CHU e KAUFMAN, 2018); e MT-CO1, considerado um indicador indireto de atividade e quantidade de mtDNA (GHAFFARI et al., 2015).

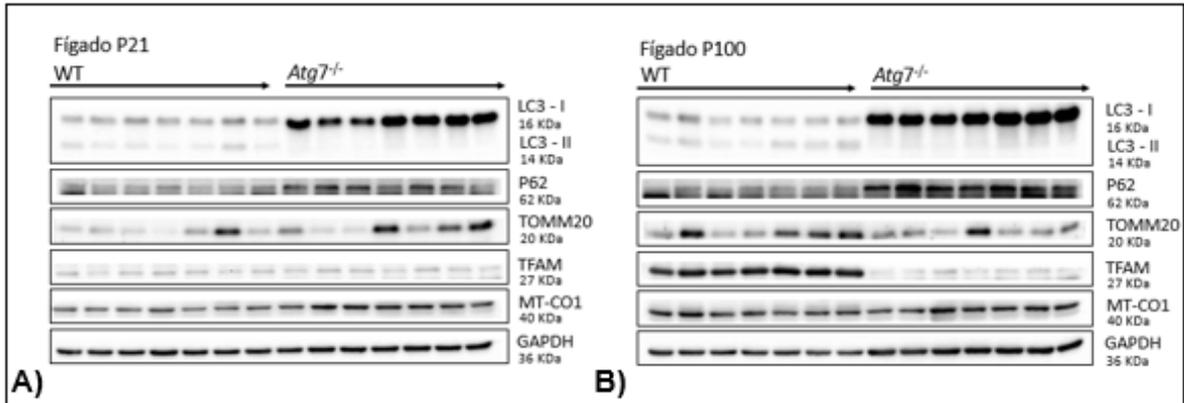


Figura 12: Avaliação do conteúdo proteico de proteínas relacionadas a autofagia. Mensuramos os níveis de proteínas envolvidas na autofagia, como por exemplo LC3-I, LC3-II e P62, Além de proteínas envolvidas na biogênese de mtDNA, como as proteínas TOMM20, MT-CO1 e TFAM. Foi analisado o fígado de animais em P21 (A) e em P100 (B), para os dois grupos de interesse.

Houve aumento nos níveis de MAP1LC3A/B I (LC3 – I) e P62/SQSTM-1 (P62) nos fígados de animais *Atg7*^{-/-}, em ambas as idades (Figura 13A e B, respectivamente). Esses resultados, somados a ausência de detecção da banda correspondente a MAP1LC3A/B II (LC3 – II) no grupo *Atg7*^{-/-} do P21 e P100 (Figura 12A e B), são sugestivos de boqueio no fluxo autofágico. O grupo *Atg7*^{-/-} no P21, comparado ao WT, também apresentou maiores níveis de TOMM20 e MT-CO1 (Figura 13C e D, respectivamente); essas são proteínas mitocondriais respectivamente codificadas pelo nDNA e mtDNA. Apesar dessas proteínas aumentarem nos fígados WT do P21 para o P100, não se observou diferença delas entre fígados WT e *Atg7*^{-/-} no P100. Também, um aumento significativo foi detectado para os níveis de TFAM no grupo WT do P21 para o P100. No entanto, o grupo *Atg7*^{-/-} não apresentou tal aumento, pelo contrário, os níveis de TFAM diminuíram no fígado P100.

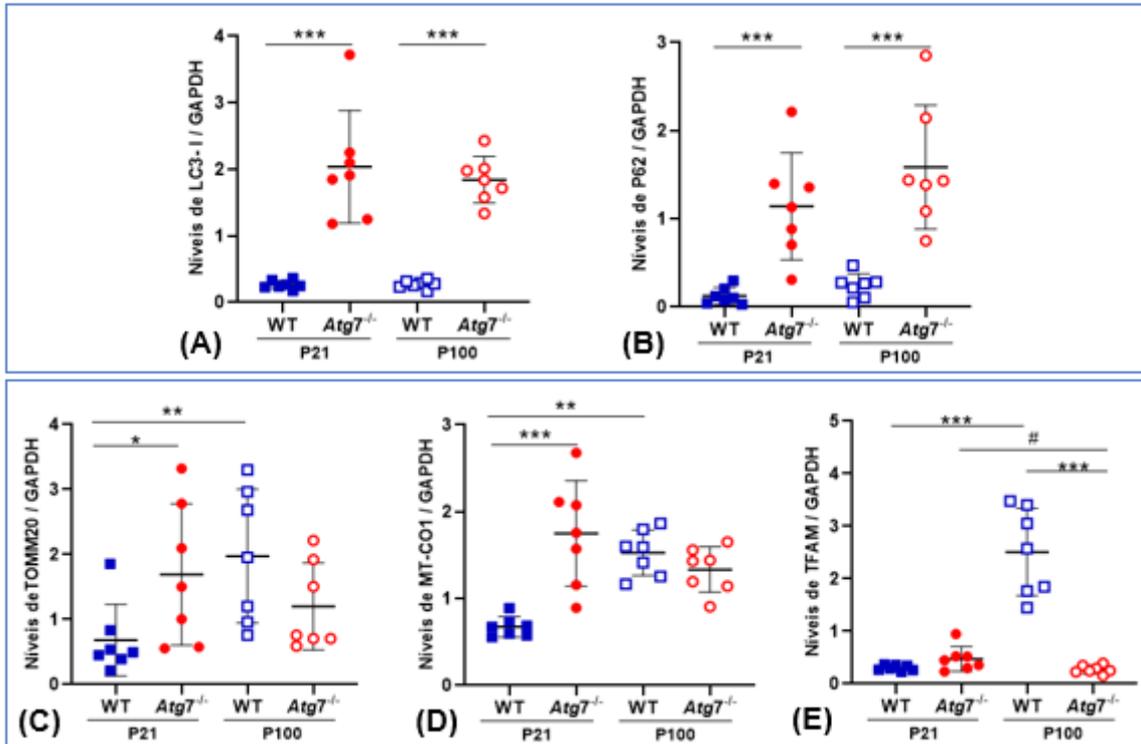


Figura 13: Proteínas relacionadas ao funcionamento mitocondrial. Níveis elevados de proteínas LC3-I e P62 foram encontrados no grupo *Atg7*^{-/-}, P21 e P100 (A). Os níveis de TOMM20 (C) e MT-CO1 (D) encontram-se aumentados no grupo *Atg7*^{-/-} (P21 e P100) e no WT (P100). Enquanto, os níveis de TFAM (E) não aumentaram no grupo *Atg7*^{-/-} com a idade. Os grupos foram comparados por teste T e foi considerado $P < 0,05$ como significativo.

5. DISCUSSÃO

O presente projeto visou analisar se o nocaute condicional do gene *Atg7* influencia no acúmulo hepático de mtDNA NZB em camundongos heteroplásmicos. O gene *Atg7*, em camundongos, é formado pela compilação de 17 éxons, sendo o éxon 14 responsável pela codificação do resíduo de cisteína do sítio ativo essencial para lipidação do LC3-I, por exemplo (KOMATSU et al., 2005). Para confirmar a excisão desse éxon, realizamos genotipagens por PCR convencional que possibilitaram a separação dos animais em dois grupos: o WT, o qual possuía a cópia *Atg7* selvagem, e o *Atg7^{-/-}*, com a cópia *Atg7* flanqueada por sítios loxP em todos os tecidos. Uma vez que todos esses animais eram transgênicos para *Alb-Cre*, somente no fígado verificou-se a forma excisada do alelo *Atg7* em decorrência da recombinação dos sítios loxP (Figura 5).

A comprovação do modelo experimental também ocorreu através da verificação de altos níveis de LC3 – I e P62 no grupo *Atg7^{-/-}* (Figura 13A e B, respectivamente), somados a ausência de detecção nesse mesmo grupo de LC3 – II (Figura 12). As proteínas LC3 – I e LC3 – II são consideradas marcadores padrão de autofagossomos. Por meio da ação de várias enzimas, incluindo a ATG7, a ativação autofágica resulta na conversão de LC3 – I em LC3 – II. Assim, a ausência de LC3 – II no fígado de animais *Atg7^{-/-}* constitui forte evidência de bloqueio autofágico, consequentemente resultando no acúmulo de LC3 – I. Os níveis aumentados de P62 também apontam nesse sentido, uma vez que este medeia a interação do autofagossomo com o substrato a ser degradado. Por tanto, o acúmulo de P62 é indicativo de acúmulo de substratos marcados para degradação autofágica (RUNWAL; STAMATAKOU; SIDDIQI; PURI; ZHU E RUBINSZTEIN, 2019).

Após a confirmação do nocaute condicional, buscamos analisar a segregação do mtDNA NZB nos diferentes grupos e momentos considerados. A segregação de mtDNA específica do fígado e relacionada à idade foi amplamente relatada em camundongos e humanos nas últimas décadas (PIKÓ et al, 1988; JENUTH et al, 1997; LI et al, 2015; NAUE et al, 2015; LECHUGA-VIECO et al, 2020; SHARPLEY et al, 2012; SAMUELS et al, 2013; BURGSTALLER et al, 2014). Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o envelhecimento de camundongos heteroplasmáticos por 100 dias resultou em forte acúmulo de mtDNA NZB no fígado

(delta NZB = 27,7 e delta NZB transformado = 1,44), se comparado com tecidos com segregação neutra, como o coração (2,7 e 0,11, respectivamente) e o cérebro (2,9 e 0,13, respectivamente) (MACHADO et al, 2015).

Em contraste com esses achados anteriores, nossos dados atuais apontam que o nocaute do *Atg7* resultou em níveis estáveis de mtDNA NZB no fígado (Figuras 6C e 9B). De forma bastante evidente, o delta NZB transformado do grupo *Atg7^{-/-}* (Figuras 7 e 10) apresentou h' próximo de zero tanto no P21 como no P100. Este resultado é cerca de 10 vezes menor nos fígados *Atg7^{-/-}* do que que no grupo WT com 100 dias (Figura 10), indicando que a deficiência de ATG7 bloqueou o acúmulo de mtDNA NZB no fígado desses animais.

Para investigar outras consequências do bloqueio autofágico, mensuramos o número de cópias de mtDNA por célula e os níveis de diferentes proteínas envolvidas na renovação e degradação mitocondrial. No P21, o fígado dos animais do grupo *Atg7^{-/-}* apresentou cerca de 2.500 cópias de mtDNA a mais que o grupo WT com a mesma idade (Figura 8A). Esse aumento significativo no número de cópias corrobora o bloqueio autofágico uma vez que na ausência de degradação é esperado o acúmulo de mitocôndrias/mtDNA. Além disso, o aumento de TOMM20 e MT-CO1 (Figura 13C e D, respectivamente) respalda o acúmulo de mitocôndrias no fígado de animais *Atg7^{-/-}* no P21.

Em animais P100, o grupo *Atg7^{-/-}* apresentou aproximadamente 1.000 cópias de mtDNA a menos que o grupo WT (Figura 11A). Essa redução é explicada tanto pelo aumento do número de cópias de mtDNA no grupo WT do P21 para o P100, como pela redução do número de cópias de mtDNA no grupo *Atg7^{-/-}* no mesmo período (Figura 11). Em paralelo, os níveis de TOMM20 e MT-CO1 aumentaram do P21 para o P100 em animais WT, mas mantiveram-se estáveis nos animais *Atg7^{-/-}* (Figuras 13C e D). Como resultado, não foi observada diferença entre animais WT e *Atg7^{-/-}* quanto aos níveis de TOMM20 e MT-CO1 no P100, sugerindo que a redução no número de cópias de mtDNA nos animais *Atg7^{-/-}* no P100 não foi acompanhada por redução do número de mitocôndrias. Diante dessa hipótese, mensuramos os níveis de TFAM, uma importante proteína envolvida no empacotamento e regulação da transcrição e replicação de mtDNA (KANG; CHU e KAUFMAN, 2018). Nossos dados apontam que os níveis de TFAM estavam aumentados em cerca de 9 vezes nos animais WT comparado ao *Atg7^{-/-}* no P100 (Figura 13E). Os níveis de TFAM nos

animais *Atg7^{-/-}* inclusive mostraram-se menores no P100 em comparação ao P21 (Figura 13E), indicativo de possível repressão da replicação do mtDNA nesse grupo.

Com base nos resultados acima, e considerando que a proliferação celular bem como a replicação seletiva foram anteriormente excluídas como atuando sobre a segregação do mtDNA NZB no fígado (BATTERSBY et al., 2001; LECHUGA-VIECO et al., 2020), sugerimos que a autofagia é o principal mecanismo responsável por este fenótipo no fígado. Resultados obtidos por Lechuga-Vieco e colaboradores (2020), apontam para evidências de que a segregação do mtDNA em camundongos heteroplásmicos BL6/NZB é determinada pela eliminação do mtDNA menos adaptado (LECHUGA-VIECO et al, 2020). Já De Grey (1997) propôs que, ao acentuar o defeito sobre a função mitocondrial e a geração de ROS, o acúmulo de moléculas deletérias como o mtDNA NZB acaba por mitigar um possível dano maior ao fígado e a sobrevivência do animal como um todo (DE GREY, 1997). Portanto, é possível que as mutações deletérias no mtDNA se adequem melhor ao metabolismo hepático, acumulando-se por ação da autofagia ao longo do tempo (Figura 14).

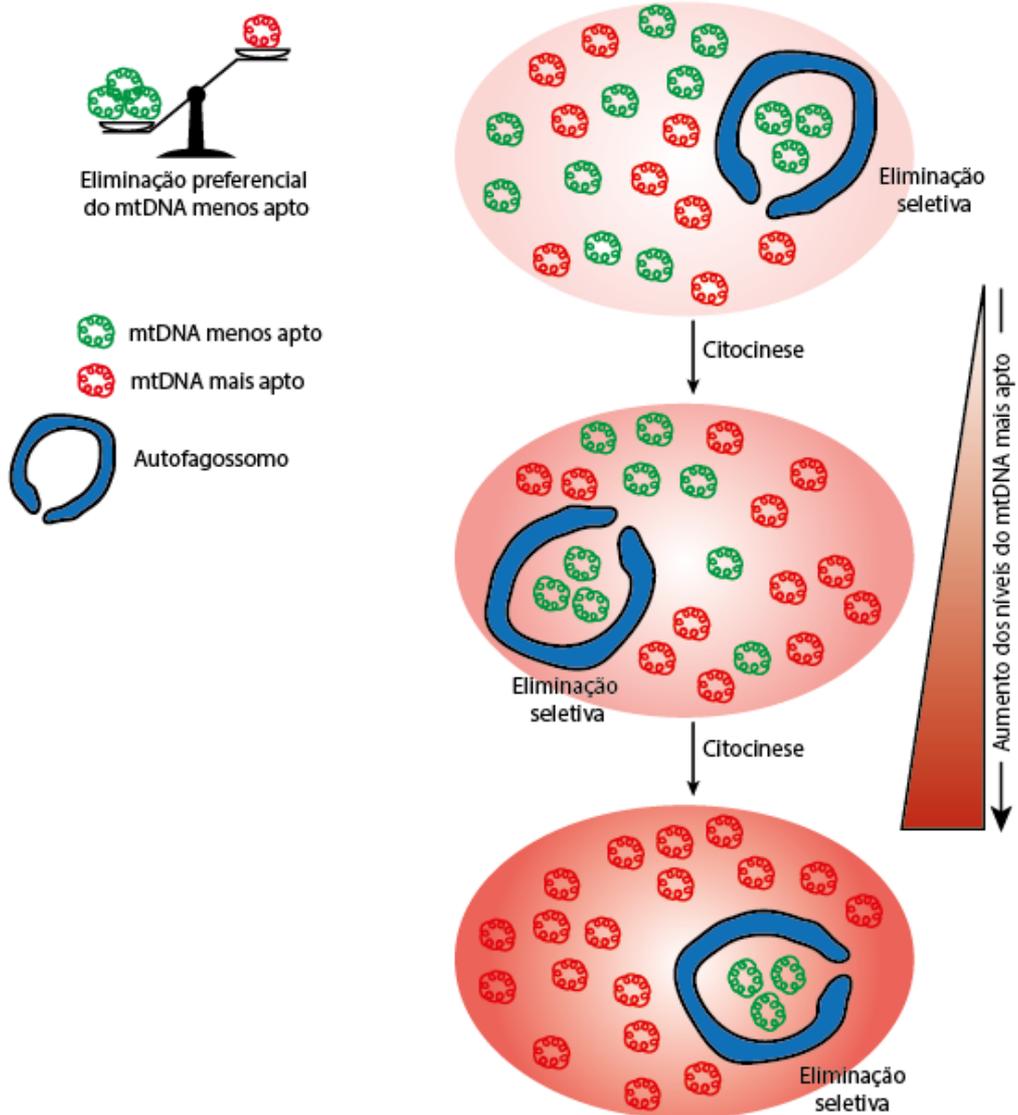


Figura 14: Modelo hipotético que explica a segregação de mtDNA específica do fígado. A segregação mitocondrial no fígado é uma consequência da depuração autofágica do mtDNA menos adaptado. Como consequência, isso leva a um rápido acúmulo, ou mesmo fixação, dependente do tempo, do mtDNA mais adequado, que pode ser representado por uma mutação deletéria e virtualmente levar à doença. Elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, identificamos a autofagia como força motriz do acúmulo de mtDNA NZB no fígado através da eliminação seletiva de mtDNA BL6. Além disso, nossos resultados levantam a interessante possibilidade de que é possível modular os níveis heteroplásmicos por meio de drogas e de outras intervenções com vistas a regulação da autofagia. No entanto, levando em consideração que os mtDNAs NZB e BL6 são haplótipos não patológicos, resta verificar se o mesmo mecanismo se aplica a outras variantes de mtDNA, como mutações potencialmente deletérias que se acumulam no fígado durante o envelhecimento humano (LI et al, 2015). Consequentemente, estudos com o intuito de esclarecer os processos pelos quais a segregação de mtDNA ocorre no tecido hepático são essenciais para ampliar o conhecimento básico sobre o assunto e para o desenvolvimento de possíveis alternativas terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, S. e colab. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. *Nature*, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 1981.

BAEHRECKE, Eric H.. **Autophagy: dual roles in life and death?**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 6, p. 505-510, jun. 2005. Springer Science and Business Media LLC.

BATTERSBY, B. J.. **Selection of a mtDNA sequence variant in hepatocytes of heteroplasmic mice is not due to differences in respiratory chain function or efficiency of replication**. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 22, p. 2469-2479, 1 out. 2001. Oxford University Press (OUP).

BATTERSBY, Brendan J. e LOREDO-OSTI, J. C. e SHOUBRIDGE, Eric A. **Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation**. *Nature Genetics*, v. 33, n. 2, p. 183–186, 2003.

BESS, Amanda S.; CROCKER, Tracey L.; RYDE, Ian T.; MEYER, Joel N.. **Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans***. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 16, p. 7916-7931, 20 jun. 2012. Oxford University Press (OUP).

BURGSTALLER, Joerg Patrick; JOHNSTON, Iain G.; JONES, Nick S.; ALBRECHTOVÁ, Jana; KOLBE, Thomas; VOGL, Claus; FUTSCHIK, Andreas; MAYRHOFER, Corina; KLEIN, Dieter; SABITZER, Sonja. **MtDNA Segregation in Heteroplasmic Tissues Is Common In Vivo and Modulated by Haplotype Differences and Developmental Stage**. *Cell Reports*, v. 7, n. 6, p. 2031-2041, jun. 2014. Elsevier BV.

CAMPOS, Juliane C.; QUELICONI, Bruno B.; BOZI, Luiz H. M.; BECHARA, Luiz R. G.; DOURADO, Paulo M. M.; ANDRES, Allen M.; JANNIG, Paulo R.; GOMES, Kátia M. S.; ZAMBELLI, Vanessa O.; ROCHA-RESENDE, Cibele. **Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure**. *Autophagy*, v. 13, n. 8, p. 1304-1317, 9 jun. 2017. Informa UK Limited.

CARVALHO, Karen F.; MACHADO, Thiago S.; GARCIA, Bruna M.; ZANGIROLAMO, Amanda F.; MACABELLI, Carolina H.; SUGIYAMA, Fabrícia H. C.; GREJO, Mateus P.; AUGUSTO NETO, J. Djaci; TOSTES, Katiane; RIBEIRO, Fernanda K. S.. **Mitofusin 1 is required for oocyte growth and communication with follicular**

somatic cells. The FASEB Journal, v. 34, n. 6, p. 7644-7660, 12 abr. 2020. Wiley.

CHEN, Hsiuchen; CHOMYN, Anne; CHAN, David C.. **Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction.** Journal Of Biological Chemistry, v. 280, n. 28, p. 26185-26192, jul. 2005. Elsevier BV.

CHEN, Hsiuchen e CHAN, David C. **Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells.** v. 26, n. 1, p. 29–39, 2017.

CHINNERY, Patrick Francis e HUDSON, Gavin. **Mitochondrial genetics.** Oxford University Press, p. 135–159, 2013.

CRAVEN, Lyndsey; ALSTON, Charlotte L.; TAYLOR, Robert W.; TURNBULL, Doug M.. **Recent Advances in Mitochondrial Disease.** Annual Review Of Genomics And Human Genetics, v. 18, n. 1, p. 257-275, 31 ago. 2017. Annual Reviews.

DAI, Ying; ZHENG, Kangni; CLARK, Joanne; SWERDLOW, Russell H.; PULST, Stefan M.; SUTTON, James P.; SHINOBU, Leslie A.; SIMON, David K.. **Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation.** Human Molecular Genetics, v. 23, n. 3, p. 637-647, 18 set. 2013. Oxford University Press (OUP).

ERNSTER, L; SCHATZ, G. **Mitochondria: a historical review.** Journal Of Cell Biology, v. 91, n. 3, p. 227-255, 22 fev. 1981. Rockefeller University Press.

GARBER, Janet C. e colab. **GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS.**, 2011.

GHAFFARI Novin, M., NORUZINIA, M., Allahveisi, A., Saremi, A., Fadaei Fathabadi, F., Mastery Farahani, R., Dehghani Fard, A., Pooladi, A., Mazaherinezhad Fard, R., & Yousefian, E. (2015). **Comparison of mitochondrial-related transcriptional levels of TFAM, NRF1 and MT-CO1 genes in single human oocytes at various stages of the oocyte maturation.** Iranian biomedical journal, 19(1), 23–28.

GEISLER, Sven; HOLMSTRÖM, Kira M.; SKUJAT, Diana; FIESEL, Fabienne C.; ROTHFUSS, Oliver C.; KAHLE, Philipp J.; SPRINGER, Wolfdieter. **PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1.** Nature Cell Biology, v. 12, n. 2, p. 119-131, 24 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

GORMAN, Gráinee S. e colab. **Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease.** ANNALS of Neurology, p. 753–759, 2015.

GREY, Aubrey D. N. J. de. **A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging.** Bioessays, v. 19, n. 2, p. 161-166, fev. 1997. Wiley.

JENUTH, Jack P. e PETERSON, Alan C. e SHOUBRIDGE, Eric A. **Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice.** Nature Genetics, v. 16, 1997.

JOHNSON, Kenneth R.; ZHENG, Qing y; BYKHOVSKAYA, Yelena; SPIRINA, Olga; FISCHER-GHODSIAN, Nathan. **A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice.** Nature Genetics, v. 27, n. 2, p. 191-194, fev. 2001. Springer Science and Business Media LLC.

JOHNSTON, Iain G.; JONES, Nick S.. **Evolution of Cell-to-Cell Variability in Stochastic, Controlled, Heteroplasmic mtDNA Populations.** The American Journal Of Human Genetics, v. 99, n. 5, p. 1150-1162, nov. 2016. Elsevier BV.

JOKINEN, Riikka e colab. **Tissue-specific modulation of mitochondrial DNA segregation by a defect in mitochondrial division.** Oxford University Press, p. 1–9, 2015.

KABEYA, Yukiko; MIZUSHIMA, Noboru; YAMAMOTO, Akitsugu; OSHITANI-OKAMOTO, Satsuki; OHSUMI, Yoshinori; YOSHIMORI, Tamotsu. **LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation.** Journal Of Cell Science, v. 117, n. 13, p. 2805-2812, 1 jun. 2004. The Company of Biologists.

KANDUL, Nikolay P.; ZHANG, Ting; HAY, Bruce A.; GUO, Ming. **Selective removal of deletion-bearing mitochondrial DNA in heteroplasmic Drosophila.** Nature Communications, v. 7, n. 1, p. 1-11, 14 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

KANG, Inhae; CHU, Charleen T.; KAUFMAN, Brett A.. **The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms.** Febs Letters, v. 592, n. 5, p. 793-811, 15 fev. 2018. Wiley.

KOMATSU, Masaaki e colab. **Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice.** *Journal of Cell Biology*, v. 169, n. 3, p. 425–434, 2005.

KÜHLBRANDT, Werner. **Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes.** *Bmc Biology*, v. 13, n. 1, p. 1-15, 29 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

LATORRE-PELLICER, Ana; LECHUGA-VIECO, Ana Victoria; JOHNSTON, Iain G.; HÄMÄLÄINEN, Riikka H.; PELLICO, Juan; JUSTO-MÉNDEZ, Raquel; FERNÁNDEZ-TORO, Jose María; CLAVERÍA, Cristina; GUARAS, Adela; SIERRA, Rocío. **Regulation of Mother-to-Offspring Transmission of mtDNA Heteroplasmy.** *Cell Metabolism*, v. 30, n. 6, p. 1120-1130, dez. 2019. Elsevier BV.

LECHUGA-VIECO, Ana Victoria; LATORRE-PELLICER, Ana; JOHNSTON, Iain G.; PROTA, Gennaro; GILEADI, Uzi; JUSTO-MÉNDEZ, Raquel; ACÍN-PÉREZ, Rebeca; MARTÍNEZ-DE-MENA, Raquel; FERNÁNDEZ-TORO, Jose María; JIMENEZ-BLASCO, Daniel. **Cell identity and nucleo-mitochondrial genetic context modulate OXPHOS performance and determine somatic heteroplasmy dynamics.** *Science Advances*, v. 6, n. 31, p. 5345, jul. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LI, Mingkun e colab. **Extensive tissue-relates and allele-related mtdNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations.** *PNAS*, v. 112, n. 8, p. 2491–2496, 2015.

LIGHTOWLERS, Robert N e TAYLOR, Robert W e TURNBULL, Doug M. **Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?** *Science*, v. 349, n. 6255, p. 499–503, 2015.

LIU, V.. **Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing.** *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 5, p. 1268-1275, 1 mar. 1998. Oxford University Press (OUP).

MACHADO, Thiago Simões e colab. **Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL / 6 and NZB / BINJ Strains.** 2015.

MATSUDA, Noriyuki; SATO, Shigeto; SHIBA, Kahori; OKATSU, Kei; SAISHO, Keiko; GAUTIER, Clement A.; SOU, Yu-Shin; SAIKI, Shinji; KAWAJIRI, Sumihiro; SATO, Fumiaki. **PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to**

damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. Journal Of Cell Biology, v. 189, n. 2, p. 211-221, 19 abr. 2010. Rockefeller University Press.

MICHIKAWA, Y.. **Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication.** Science, v. 286, n. 5440, p. 774-779, 22 out. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

MISHRA, Prashant e CHAN, David C. **Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease.** Nature Publishing Group, 2014. v. 15.

MISHRA, Prashant; CHAN, David C.. **Metabolic regulation of mitochondrial dynamics.** Journal Of Cell Biology, v. 212, n. 4, p. 379-387, 8 fev. 2016. Rockefeller University Press

MORENO-LOSHUERTOS, Raquel e colab. **Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants.** Nature Genetics, v. 38, n. 11, p. 1261–1268, 2006.

NAGY, A. e colab. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.**, 2003.

NARENDRA, Derek; KANE, Lesley A.; HAUSER, David N.; FEARNLEY, Ian M.; YOULE, Richard J.. **P62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both.** Autophagy, v. 6, n. 8, p. 1090-1106, 16 nov. 2010. Informa UK Limited.

NARENDRA, Derek; TANAKA, Atsushi; SUEN, Der-Fen; YOULE, Richard J.. **Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.** Journal Of Cell Biology, v. 183, n. 5, p. 795-803, 24 nov. 2008. Rockefeller University Press.

NASSEH, Ibrahim E.; TENGAN, Célia H.; KIYOMOTO, Beatriz H.; GABBAI, Alberto Alain. **Doenças Mitocondriais.** Rev. Neurociências, v. 2, n. 9, p. 60-69, 2001.

NAUE, Jana; HÖRER, Steffen; SÄNGER, Timo; STROBL, Christina; HATZER-GRUBWIESER, Petra; PARSON, Walther; LUTZ-BONENGL, Sabine. **Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA.** Mitochondrion, v. 20, p. 82-94, jan. 2015. Elsevier BV.

NODA, Nobuo N. e INAGAKI, Fuyuhiko. **Mechanisms of Autophagy**. Annual Review of Biophysics, v. 44, n. 1, p. 101–122, 2015.

PARK, Sang-Hee; LEE, Ah-Reum; CHOI, Keonwoo; JOUNG, Soyoung; YOON, Jong-Bok; KIM, Sungjoo. **TOMM20 as a potential therapeutic target of colorectal cancer**. Bmb Reports, v. 52, n. 12, p. 712-717, 31 dez. 2019. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports.

PAYNE, Brendan A.I. e colab. **Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA**. Human Molecular Genetics, v. 22, n. 2, p. 384–390, 2013.

PICKLES, Sarah e VIGIÉ, Pierre e YOULE, Richard J. **Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance**. Current Biology, v. 28, n. 4, p. R142–R143, 2018.

PIKÓ, Lajos; HOUGHAM, Andrina J.; BULPITT, Ken J.. **Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging**. Mechanisms Of Ageing And Development, v. 43, n. 3, p. 279-293, jun. 1988. Elsevier BV.

PICKRELL, Alicia M.; HUANG, Chiu-Hui; KENNEDY, Scott R.; ORDUREAU, Alban; SIDERIS, Dionisia P.; HOEKSTRA, Jake G.; HARPER, J. Wade; YOULE, Richard J.. **Endogenous Parkin Preserves Dopaminergic Substantia Nigral Neurons following Mitochondrial DNA Mutagenic Stress**. Neuron, v. 87, n. 2, p. 371-381, jul. 2015. Elsevier BV.

POSTIC, Catherine; SHIOTA, Masakazu; NISWENDER, Kevin D.; JETTON, Thomas L.; CHEN, Yeujin; MOATES, J. Michael; SHELTON, Kathy D.; LINDNER, Jill; CHERRINGTON, Alan D.; MAGNUSON, Mark A.. **Dual Roles for Glucokinase in Glucose Homeostasis as Determined by Liver and Pancreatic β Cell-specific Gene Knock-outs Using Cre Recombinase**. Journal Of Biological Chemistry, v. 274, n. 1, p. 305-315, jan. 1999. Elsevier BV.

QUIRÓS, Pedro M.; LANGER, Thomas; LÓPEZ-OTÍN, Carlos. **New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease**. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 16, n. 6, p. 345-359, 13 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC.

RONCHI, Juliana A.; FIGUEIRA, Tiago R.; RAVAGNANI, Felipe G.; OLIVEIRA, Helena C.F.; VERCESI, Anibal E.; CASTILHO, Roger F.. **A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice**

results in mitochondrial redox abnormalities. Free Radical Biology And Medicine, v. 63, p. 446-456, out. 2013. Elsevier BV.

ROUBERTOUX, Pierre L; SLUYTER, Frans; CARLIER, Michèle; MARCET, Brice; MAAROUF-VERAY, Fatima; CHÉRIF, Chabane; MARICAN, Charlotte; ARRECHI, Patricia; GODIN, Fabienne; JAMON, Marc. **Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice.** Nature Genetics, v. 35, n. 1, p. 65-69, 17 ago. 2003. Springer Science and Business Media LLC.

RUNWAL, Gautam; STAMATAKOU, Eleanna; SIDDIQI, Farah H.; PURI, Claudia; ZHU, Ye; RUBINSZTEIN, David C.. **LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells.** Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1-28, 12 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

SAMUELS, David C.; LI, Chun; LI, Bingshan; SONG, Zhuo; TORSTENSON, Eric; CLAY, Hayley Boyd; ROKAS, Antonis; THORNTON-WELLS, Tricia A.; MOORE, Jason H.; HUGHES, Tia M.. **Recurrent Tissue-Specific mtDNA Mutations Are Common in Humans.** Plos Genetics, v. 9, n. 11, p. 929, 7 nov. 2013. Public Library of Science (PLoS).

SCHON, Eric A. e DIMAURO, Salvatore e HIRANO, Michio. **Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations.** Nature Reviews Genetics, v. 13, n. 12, p. 878–890, 2012.

SHARPLEY, Mark S e colab. **Heteroplasmy of Mouse mtDNA is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition.** v. 151, n. 2, p. 333–343, 2012.

STEWART, James B. e CHINNERY, Patrick F. **The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease.** Nature Reviews Genetics, v. 16, n. 9, p. 530–542, 2015.

SUEN, D.-F.; NARENDRA, D. P.; TANAKA, A.; MANFREDI, G.; YOULE, R. J.. **Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells.** Proceedings Of The National Academy Of Sciences, v. 107, n. 26, p. 11835-11840, 14 jun. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

TANIDA, Isei; TANIDA-MIYAKE, Emiko; UENO, Takashi; KOMINAMI, Eiki. **The Human Homolog of Saccharomyces cerevisiae Apg7p Is a Protein-activating Enzyme for Multiple Substrates Including Human Apg12p, GATE-16,**

GABARAP, and MAP-LC3. Journal Of Biological Chemistry, v. 276, n. 3, p. 1701-1706, jan. 2001. Elsevier BV.

TOWERS, Christina G.; WODETZKI, Darya K.; THORBURN, Jacqueline; SMITH, Katharine R.; CAINO, M. Cecilia; THORBURN, Andrew. **Mitochondrial-derived vesicles compensate for loss of LC3-mediated mitophagy.** *Developmental Cell*, [S.L.], p. 1-14, jun. 2021. Elsevier BV.

TWIG, Gilad e colab. **Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy.** *EMBO Journal*, v. 27, n. 2, p. 433–446, 2008.

WALLACE, Douglas C. **A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine.** *Annu Rev. Genet.*, v. 461, n. 3, p. 95–109, 2010.

WALLACE, Douglas C.. **Mitochondrial genetic medicine.** *Nature Genetics*, v. 50, n. 12, p. 1642-1649, 29 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

WALLACE, Douglas C e CHALKIA, Dimitra. **Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. 1–47, 2013.

WANG, Y.; MICHIKAWA, Y.; MALLIDIS, C.; BAI, Y.; WOODHOUSE, L.; YARASHESKI, K. E.; MILLER, C. A.; ASKANAS, V.; ENGEL, W. K.; BHASIN, S.. **Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication.** *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 98, n. 7, p. 4022-4027, 13 mar. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences.

WEI, Wei; TUNA, Salih; KEOGH, Michael J.; SMITH, Katherine R.; AITMAN, Timothy J.; BEALES, Phil L.; BENNETT, David L.; GALE, Daniel P.; BITNER-GLINDZICZ, Maria A. K.; BLACK, Graeme C.. **Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity.** *Science*, v. 364, n. 6442, p. 520, 23 maio 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

WHITWORTH, Alexander J.; PALLANCK, Leo J.. **The PINK1/Parkin pathway: a mitochondrial quality control system?** *Journal Of Bioenergetics And Biomembrane*, v. 41, n. 6, p. 499-503, dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

YE, K.; LU, J.; MA, F.; KEINAN, A.; GU, Z.. **Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals**. Proceedings Of The National Academy Of Science, v. 111, n. 29, p. 10654-10659, 7 jul. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences.