

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**RENAN OMETE FERREIRA**

**Caracterização das alterações transcricionais e morfológica da mitocôndria da  
prole de fêmeas obesas com deficiência da mitofusina 2 no oócito**

SÃO CARLOS – SP

2024

**RENAN OMETE FERREIRA**

**Caracterização das alterações transcricionais e morfológica da mitocôndria da prole de fêmeas obesas com deficiência da mitofusina 2 no oócito**

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

Orientador(a): Marcos Roberto Chiaratti

SÃO CARLOS – SP

2024

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson e Gisela, alicerces da minha vida.

Ao meu irmão, Rodolfo, que sempre esteve ao meu lado.

Às minhas avós, Rosalina e Amélia, pelas pérolas do conhecimento.

Ao meu avô, Mauro, por me iluminar como um farol de sabedoria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de São Carlos, que providenciou um ambiente rico em conhecimento e momentos de reflexão, importante para minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, que me guiou até aqui, confiando na minha capacidade em contribuir para seu grupo de pesquisa, para a Saúde e à Ciência. Agradeço por todo auxílio e apoio.

A todos docentes da graduação que influenciaram na minha maneira de ver o mundo e na forma de agir, estimulando a busca pela sabedoria.

À professora Nadja Cristhina de Souza Pinto pelas contribuições para a produção do presente trabalho.

Aos meus amados amigos e colegas de laboratório, os quais foram importantes para meu crescimento na pesquisa e graduação, Angélica Camargo, Carolina Habermann Macabelli, Daniel de Lima Cometta, Fabrícia H. C. Sugiyama, Jaiane Santana da Paz, José Djaci Augusto Neto, Júlio C. V. Roncato, Katiane Tostes, Lindomar de Oliveira Alves, Mateus Priolo Grejo, Rachel Marascalchi e Victória C. C. P. Hass Gonçalves. Cada um de vocês trouxe luz e alegria ao meu caminho.

Aos meus admiráveis amigos e colegas da graduação, Amanda Tejada, Conny Fukuyama, Ellen Sousa, Felipe Ribaldo, Gabriel Arantes, Isabela Dolci, Maria Júlia Mattos, Matheus Pintor, Vinicius Cauan, Ygor Osti e Wesley dos Santos, além de todos os outros que não pude citar aqui. Vocês foram meu refúgio e minha fundação.

Aos meus estimados amigos, Gabriel Beckner, Vinicius Moura Tédde, Davi Silva, Lucas Britto, Victor Balthazar, Tainara Nascimento, Luís Carlos, Gabriel Salomão e Felipe Salomão, que me apoiaram em tempos difíceis, verdadeiros tesouros que enriqueceram minha vida.

A FAPESP pela bolsa (processo 2022/09281-1) e apoio financeiro aos experimentos (processo 2020/15412-6 e 2017/04372-0).

*“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé”.*

(Paulo de Tarso)

## RESUMO

Doenças cardíacas estão entre as principais causas de morte no mundo e pesquisas realizadas evidenciam uma intrínseca relação entre efeitos cardiológicos na progênie e a obesidade materna. Além disso, surgem cada vez mais indícios do possível envolvimento da mitocôndria nos oócitos como fatores que auxiliam para o efeito materno. Assim, essas alterações acabam sendo transmitidas adiante para a progênie, associando-se com distúrbios metabólicos e cardíacos. Portanto, a MFN2, um importante modulador do metabolismo que está localizado na mitocôndria e no RE, parece ter um papel fundamental na transmissão de condições e mudanças metabólicas para a progênie. Com isso, o trabalho atual buscou determinar as mudanças transcricionais e na morfologia mitocondrial no tecido cardíaco de murinos nascidos de mães obesas com nocaute oócito-específico da MFN2. Para isso, foram coletados tecidos cardíacos da progênie que eram oriundos de um acasalamento de fêmeas obesas com nocaute oócito-específico da MFN2 e machos selvagens. Depois da coleta, foi extraído e purificado o conteúdo de RNA desses tecidos para a produção de bibliotecas de RNA-Seq, examinando a qualidade e quantidade do transcrito, convertendo-o subsequentemente em cDNA, com a ligação de adaptadores nas extremidades da molécula, seguido de sequenciamento e geração de dados de expressão diferencial. Foi avaliado, dessa maneira, os níveis de transcrição do tecido cardíaco, assim como as principais vias reguladas diferencialmente com o auxílio da plataforma DAVID e do ambiente de desenvolvimento integrado RStudio para as análises de expressão diferencial. Ainda, buscou-se determinar parâmetros da morfologia mitocondrial do tecido da progênie dessas fêmeas obesas que apresentavam nocaute oócito-específico da MFN2 por meio da obtenção de imagens de microscopia eletrônica de transmissão e análises realizadas no software ImageJ. Assim, os resultados indicaram uma profunda mudança na transcrição no tecido cardíaco desses animais, com impactos na via de fosforilação oxidativa e relacionadas à cardiomiopatia diabética, apesar de alterações pouco significativas nas análises quantitativas da morfologia das mitocôndrias. Portanto, o nocaute da MFN2 no oócito está relacionado com a transmissão de efeitos à nível transcricional no tecido cardíaco da progênie.

**Palavras-chave:** KO MFN2; Herança Unidirecional; Mitocôndrias; Coração.

## ABSTRACT

Heart disease is one of the main causes of death worldwide and research has shown an intrinsic relationship between cardiac effects in offspring and maternal obesity. In addition, there is increasing evidence of the possible involvement of mitochondria in oocytes as factors that contribute to the maternal effect. Thus, these alterations end up being passed on to the offspring and are associated with metabolic and cardiac disorders. Therefore, MFN2, an important modulator of metabolism that is located in the mitochondria and the ER, appears to play a fundamental role in transmitting metabolic conditions and changes to the offspring. With this information in mind, the current study sought to determine the transcriptional changes and mitochondrial morphology in the cardiac tissue of mice born to obese mothers with oocyte-specific MFN2 knockouts. For this purpose, cardiac tissues were collected from the offspring of obese females with oocyte-specific knockout of MFN2 and wild males. After collection, the RNA content of these tissues was extracted and purified for the production of RNA-Seq libraries, assessing the quality and quantity of the transcript, subsequently converting it into cDNA by attaching adapters to the ends of the molecule, followed by sequencing and the generation of differential expression data. In this way, the levels of transcription in cardiac tissue were assessed, as well as the main differentially regulated pathways, using the DAVID platform and the RStudio integrated development environment for differential expression analysis. In addition, we sought to determine parameters of mitochondrial morphology in the tissue of the offspring of these obese females with oocyte-specific MFN2 knockouts by obtaining transmission electron microscopy images and analyzing them using ImageJ software. Thus, the results indicated a profound change in the transcription in cardiac tissue of these animals, with impacts on the oxidative phosphorylation pathway and related to diabetic cardiomyopathy, despite insignificant changes in the quantitative analysis of mitochondrial morphology. Therefore, the MFN2 knockout is related to the transmission of effects at the transcriptional level in the cardiac tissue of the offspring.

**Keywords:** KO MFN2; Unidirectional Inheritance; Mitochondria; Heart.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Gráfico de dispersão, F1 KO vs F1 WT, dieta HFD. ....	31
<b>Gráfico 2</b> - Gráfico de dispersão, F1 KO vs F1 WT, dieta NFD. ....	32
<b>Gráfico 3</b> - Plano das duas principais componentes, dieta HFD.....	35
<b>Gráfico 4</b> - Plano das duas principais componentes, dieta NFD.....	36
<b>Gráfico 5</b> - Gráfico de barras para as vias enriquecidas para DEGs F1 KO x F1 WT, dieta HFD. ....	37
<b>Gráfico 6</b> - Gráfico de barras para as vias enriquecidas para DEGs F1 KO x F1 WT, dieta NFD. ....	38
<b>Gráfico 7</b> - Boxplot da razão entre o diâmetro maior e o menor. ....	45
<b>Gráfico 8</b> - Boxplot da área. ....	45
<b>Gráfico 9</b> - Boxplot do perímetro ....	46
<b>Gráfico 10</b> - Gráfico de densidade da AR. ....	46
<b>Gráfico 11</b> - Gráfico de densidade de área. ....	47
<b>Gráfico 12</b> - Gráfico de densidade do perímetro. ....	47
<b>Gráfico 13</b> - Normal Q-Q plot para o perímetro do grupo KO/HFD. ....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Tabela indicando os valores da média da área, perímetro e AR para cada grupo, com os respectivos desvios-padrões.....	44
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquematização dos grupos experimentais. ....	27
<b>Figura 2</b> - “Workflow” TruSeq Stranded mRNA. ....	29
<b>Figura 3</b> - “Heatmap” F1 KO vs F1 WT, dieta HFD. ....	33
<b>Figura 4</b> - “Heatmap”, F1 KO vs F1 WT, dieta NFD. ....	34
<b>Figura 5</b> - Mapa de via: Fosforilação Oxidativa, F1 KO x F1 WT, ração HFD.....	39
<b>Figura 6</b> - Mapa de via: Fosforilação Oxidativa, KO x WT, ração NFD.....	40
<b>Figura 7</b> - Mapa de via: Cardiomiopatia Diabética, F1 KO x F1 WT, ração HFD. ....	41
<b>Figura 8</b> - Mapa de via: Cardiomiopatia Diabética, F1 KO x F1 WT, ração NFD. ....	42
<b>Figura 9</b> - Imagem capturada pelo microscópio de uma mitocôndria do grupo F1 KO, dieta HFD. ....	43
<b>Figura 10</b> - Imagem capturada pelo microscópio de uma mitocôndria do grupo F1 WT, dieta HFD. ....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBESIDADE E DIETA .....	13
2.2 MUDANÇAS FISIOPATOLÓGICAS .....	14
2.3 HERANÇA MATERNA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA LINHAGEM GERMINATIVA.....	15
2.4 MITOCÔNDRIA E DINÂMICA MITOCONDRIAL .....	18
2.5 INTERAÇÃO MITOCÔNDRIA – RE.....	20
2.6 ENDEREÇAMENTO DAS PROTEÍNAS PARA A MITOCÔNDRIA.....	21
2.7 PAPEL DA MITOFUSINA 2 .....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
4.1 OBTENÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL .....	26
4.2 GENOTIPAGEM.....	26
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	27
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	28
4.5 RNA-SEQ .....	28
4.6 ANÁLISE DE DADOS .....	30
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1 TRANSCRIPTOMA DO TECIDO CARDÍACO.....	31
5.2. ÁREA, PERÍMETRO E AR DAS MITOCÔNDRIAS.....	43
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A transmissão materna tem um papel importante na perpetuação de características e alterações para a progênie. Um dos principais motivos dessa passagem transgeracional de distúrbios se deve à herança mitocondrial e de marcas epigenéticas no DNA nuclear e no mtDNA. Apesar dos eventos da oôgenese serem extremamente bem regulados durante o desenvolvimento do oócito, há evidências de que mudanças no metabolismo, por conta do ambiente alterado no oócito, resultam em disfunções na atividade mitocondrial, além de mudanças na dinâmica e função das mitocôndrias, assim como na comunicação entre outras organelas. Com isso, pode ser que reprogramações e adaptações em resposta a essas modificações nas células germinativas femininas estejam relacionadas com desenvolvimento de características moleculares alteradas na progênie. (CHIARATTI, 2021).

Adicionalmente, a mitofusina 2, uma enzima GTPase transmembranar, atua na dinâmica mitocondrial, em específico da fusão da membrana externa entre mitocôndrias, podendo regular, ainda, interações com outras organelas na célula. Ela está presente tanto no retículo endoplasmático (RE) quanto na mitocôndria. Alterações na expressão dessa proteína são muitas vezes ligadas com impacto no metabolismo celular, mediando alterações na atividade e função mitocondrial, no estresse oxidativo e do RE, além do desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e neurológicas (EMERY; ORTIZ, 2021). No oócito, a deleção da mitofusina 2 guia para uma profunda mudança transcriptômica. Ademais, ocorre o impacto da função mitocondrial em oócitos ovulados (GARCIA et al., 2020). Consequentemente, há repercussões da deficiência da mitofusina 2 no desenvolvimento do oócito e no processo de maturação da célula germinativa (LIU et al., 2016).

Portanto, sabendo da importância da mitofusina 2 (MFN2) e seu papel no metabolismo e no desenvolvimento do oócito, esse trabalho buscou elucidar mecanismos moleculares implícitos da programação do oócito e na transmissão materna de alterações que levam a consequências transcricionais no tecido cardíaco da progênie.

## 2. REVISÃO

### 2.1 OBESIDADE E DIETA

A obesidade, resultante de uma interação entre genótipo e ambiente, é uma doença crônica multifatorial e complexa (CORNIER et al., 2011). Por sua vez, desde 1980 percebe-se que a prevalência da obesidade dobrou em mais de 70 países. Diante disso, a sua alta prevalência está alarmante considerando que a obesidade, frequentemente definida pelo Índice de Massa Corporal (IMC), foi estimada por causar 4 milhões de mortes globalmente. Além disso, mais de dois terços dessas mortes foram consequências de doenças cardiovasculares (DCV) em 2017 (ELAGIZI et al., 2020).

Do outro lado, de acordo com a “American Heart Association” (AHA), o sedentarismo foi apontado como um dos principais fatores evitáveis de morte, existindo uma relação inversamente linear entre o volume de atividade física e as causas de mortalidade em geral (MARCUS et al., 2006). Igualmente, foi estimado que cerca de 1,9 milhão de mortes no mundo por ano estão vinculadas com a falta de atividade física. De fato, a obesidade e a falta de atividade física são considerados dois fatores de risco que aumentam a morbidade e a mortalidade numa escala global (WEINTRAUB et al., 2011).

Dado o exposto, nota-se um grande impacto econômico devido à morbidade correlacionada com o sedentarismo e a obesidade, uma vez que se tornam motivos de aumento de gastos com a saúde e efetividade no trabalho. Assim, é descrito a associação do déficit de atividade física com gastos relacionados a saúde nos Estados Unidos. Com isso, evidenciou-se, em suma, na perspectiva econômica da saúde, que a atividade física é positivamente custo-efetiva. Da mesma forma, a falta da mesma pode vir a ser bastante custosa para a saúde (CARLSON et al., 2015; LAVIE; ARENA; BLAIR, 2016).

No Brasil, segundo Estivaleti et al. (2022), há um aumento da epidemia de obesidade no Brasil. Com isso, constatou-se que quadros de sobrepeso e obesidade aumentaram em todos grupos sociodemográficos entre os anos de 2006 e 2019. Posto isto, a projeção para a prevalência da obesidade é de que, até 2030, pode afetar 3 em cada 10 adultos brasileiros.

Outrossim, um outro aspecto relevante associado à obesidade e, conseqüentemente, às síndromes metabólicas é a dieta do indivíduo. Nesse sentido, existem vários estudos e análises sobre a relação do padrão de dieta e a obesidade/sobrepeso. Os resultados dessas pesquisas indicaram que um padrão de dieta saudável poderia estar relacionado com a redução do risco de obesidade ou sobrepeso. Do outro lado, uma dieta ocidental ou não-saudável teria a possibilidade de aumentar esses riscos (MU et al., 2017).

Ainda, há um papel fundamental no estilo de dieta consumida pela população. Assim, o padrão de dieta ocidental nada mais é do que um consumo extremamente alto de alimentos ricos em lipídeos saturados e carboidratos saturados, marcados pela rápida absorção e disponibilidade para o organismo. Esse padrão de dieta geralmente está relacionado com o desenvolvimento de obesidade e sobrepeso (LÓPEZ-TABOADA; GONZÁLEZ-PARDO; CONEJO, 2020). Conseqüentemente, esse consumo está relacionado com distúrbios que afetam as respostas inflamatórias no corpo humano. Além disso, há perturbações da homeostase imuno-metabólica, guiando para inúmeras desordens metabólicas, como obesidade, intolerância à glicose, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e impactos na qualidade da fertilidade, com redução da qualidade do oócito e alterações do ambiente folicular por exemplo (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019; SILVESTRIS; LOVERO; PALMIROTTA, 2019).

## 2.2 MUDANÇAS FISIOPATOLÓGICAS

As alterações fisiopatológicas ocasionadas pela obesidade e a dieta ocorrem em inúmeros tecidos e órgãos. Estas mudanças estão vinculadas com vários distúrbios metabólicos e doenças. Dessa maneira, a atribuição do risco excessivo de doenças cardiovasculares na obesidade está relacionada com a capacidade do acúmulo de gordura no organismo em induzir mudanças estruturais e na função cardíaca. Além disso, existe uma notável associação entre a obesidade e outros fatores de risco de doenças cardiovasculares, como é o caso da hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia, aterosclerose e outras síndromes metabólicas (LAVIE et al., 2018; OKTAY et al., 2017; PARTO; LAVIE, 2017).

Por conseguinte, o mecanismo de alguns desses fatores está integrado, de certa forma, ao simples aumento da massa corporal e do espaço físico dos tecidos e

órgãos. Exemplifica-se, portanto, o aumento de lipossomos nos hepatócitos, levando a uma doença hepática gordurosa não alcoólica. Assim como há hipereatividade crônica do sistema nervoso simpático, implicando o desdobramento de uma hipertensão em indivíduos obesos (HEYMSFIELD; WADDEN, 2017).

Já no sistema cardiovascular, a obesidade pode levar a múltiplos efeitos, incluindo mudanças hemodinâmicas e alterações nas funções e estruturas endotelial e cardíaca. Ademais, devido ao aumento do volume total de sangue, na frequência cardíaca e no débito cardíaco, por conta do excesso de massa corporal, há maior intensidade no trabalho cardiovascular. Consequentemente, esse aumento pode causar dilatação do ventrículo esquerdo e hipertrofia, o que podem resultar em disfunções diastólicas e sistólicas (LAVIE et al., 2014).

### 2.3 HERANÇA MATERNA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA LINHAGEM GERMINATIVA

As mitocôndrias são organelas essenciais, sendo a fonte primária de produção de ATP pela fosforilação oxidativa (WALLACE, 2013). Além disso, ela executa funções importantes em inúmeros processos celulares, relacionada ao metabolismo de aminoácidos e de lipídios. Assim como outras organelas endossimbióticas, ela possui seu próprio DNA (mtDNA). Nos seres humanos, o mtDNA codifica 13 subunidades polipeptídicas essenciais para o processo de fosforilação oxidativa, 22 tRNAs e 2 rRNAs (ANDERSON et al., 1981). Mutações no mtDNA estão ligadas com inúmeras doenças, como as de origem mitocondrial, diabetes mellitus e câncer (ISHIKAWA et al., 2008; JA, 2004; WALLACE, 1999). Nesse contexto, o mtDNA é herdado de uma maneira não-mendeliana. Assim, é amplamente evidenciado que a maioria dos animais herdam as mitocôndrias somente do oócito (ANKEL-SIMONS; CUMMINS, 1996; BIRKY, 1995; GILES et al., 1980).

Esse tipo de herança é denominado muitas vezes como herança uniparental. Portanto, muitas doenças de origem mitocondrial são herdadas de forma materna (BIRKY, 1995). Nos mamíferos, a mitocôndria derivada paternalmente entra, em geral, no ambiente citoplasmático do oócito, coexistindo temporariamente ao lado do excesso de mitocôndrias de origem materna no zigoto. Não obstante, as mitocôndrias paternas e seu DNA são de certo modo eliminados e nunca transmitido para a próxima geração (ANKEL-SIMONS; CUMMINS, 1996).

Durante o desenvolvimento do embrião, também conhecida como embriogênese, as fases iniciais são marcadas por intensa divisão celular, originando o blastocisto. Durante esses estágios, o embrião depende estritamente de elementos herdados da mãe, desenvolvidos no oócito, como mRNAs, proteínas e as mitocôndrias, demonstrando baixa atividade mitocondrial, evitando danos por oxidação (LEESE, 2012). Uma vez alcançado a fase de blastocisto, há um aumento da produção de proteína, com a suprarregulação da atividade mitocondrial nas células que originarão tecidos extraembrionários, enquanto ocorre a expansão da blastocele (HASHIMOTO et al., 2017; ST. JOHN, 2019; MAY-PANLOUP et al., 2005; TRIMARCHI et al., 2000). Interessantemente, no embrioblasto, a manifestação da função mitocondrial é tardia, especificamente na massa interna que derivará o embrião. De forma aparente, a estrutura e a atividade da mitocôndria permanece em carência nas células ligadas com a linhagem germinativa, apenas retomando as devidas funções após a diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs) (CHIARATTI et al., 2018; CREE et al., 2008; FLORES et al., 2018; MOTTA et al., 2000; ST. JOHN, 2019; ST. JOHN et al., 2010; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008; WASSARMAN; JOSEFOWICZ, 1978).

Assim, durante o desenvolvimento do feto, as PGCs, após migrarem para a crista genital, começam a se proliferarem rapidamente, o que resulta posteriormente em oogônias na fêmea (LEITCH; TANG; SURANI, 2013). Após a entrada no processo de meiose, começa a ser formado uma fina camada de células somáticas em torno do oócito, resultando em etapas seguintes nos folículos primordiais, que constituem a reserva ovariana que carrega os gametas femininos, com posterior adequação do ambiente do ovário para o crescimento e maturação dos folículos (CLARKE, 2018; OKTEM; URMAN, 2010).

Além disso, há o acúmulo de moléculas relevantes para a embriogênese, como a própria mitocôndria, com um aumento cerca de 1000 vezes em quantidade (CREE et al., 2008; JANSEN; DE BOER, 1998; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008; ST. JOHN, 2019). Entretanto, existem evidências de que elas sejam pouco ativas ou funcionais nos oócitos, como mostrado quando há a falta de uma proteína para a atividade mitocondrial, a PDHA1; dessa forma, mesmo na ausência dessa enzima, o oócito se desenvolvia e avançava para as próximas etapas da meiose, com a consequente ovulação (ARHIN et al., 2018; JOHNSON et al., 2007).

Diante do exposto, é importante compreender como são transmitidas certas doenças, dentro desse contexto. Como posto anteriormente, a obesidade, assim como outras comorbidades, tal qual a diabetes, são doenças que vêm ganhando cada vez mais notoriedade. Com isso, é evidenciado um aumento dos casos todos os anos, ressaltando-se que metade da população global sofria com essa síndrome em 2019 (BARNETT, 2019; BLÜHER, 2019). Além do próprio fator ambiental, há a transmissão de elementos genéticos pelos pais, com uma grande contribuição pela parcela materna (JUNGHEIM et al., 2010; LUZZO et al., 2012; RATTANATRAY et al., 2010; RUAGER-MARTIN; HYDE; MODI, 2010; SHANKAR et al., 2008).

Ainda, em fêmeas de camundongos que tiveram uma indução à obesidade demonstraram que os filhotes apresentaram aumento do percentual de gordura e colesterol; além disso, percebeu-se que essas síndromes eram observadas até a terceira geração, mesmo com uma dieta normal (JUNGHEIM et al., 2010; SABEN et al., 2016). Sabendo disso, um dos principais alvos para o estudo da transmissão dessas doenças acabou sendo a mitocôndria. De maneira interessante, as disfunções nas mitocôndrias foram relacionadas com essas síndromes metabólicas em inúmeros estudos, como a diabetes, problemas cardiovasculares e obesidade (FEREY et al., 2019; SARPARANTA; GARCIA-MACIA; SINGH, 2017; SILVA et al., 2000). Por conseguinte, achados elucidaram que muitas mutações no mtDNA, de regiões codificantes e não codificantes, direcionavam para transmissão para a prole dessas doenças (DING et al., 2018; KAUFMAN; LI; SOLEIMANPOUR, 2015; POULTON et al., 1998; SILVA et al., 2000).

Ademais, outros agentes foram ligados com essas comorbidades passadas para as próximas gerações. A obesidade, por exemplo, encaminha para um acúmulo de lipídeos no ambiente folicular da fêmea, incluindo o próprio oócito. Desse modo, há alterações e danos na atividade das mitocôndrias e organelas com a qual esta interage, como o caso do retículo endoplasmático (FULLSTON et al., 2015; RUEBEL et al., 2017; WANG et al., 2009; WU et al., 2010).

À vista disso, essas mudanças podem ocasionar na ativação de uma resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, além da liberação de  $Ca^{2+}$  e perturbações nas atividades mitocondriais e na homeostase do oócito, impactando até na competência e na fertilidade (HOU et al., 2016; LUZZO et al., 2012; PASQUARIELLO et al., 2019; WU et al., 2015, 2010). Portanto, essas diferenças originadas na organela podem ser herdadas pelos filhos, com uma

sinalização de insulina periférica prejudicada, a qual está relacionada com disfunções da mitocôndria e de sua dinâmica no músculo esquelético, alcançando até a terceira geração. Outrossim, foi evidenciado condições anormais das mitocôndrias também na primeira e na segunda geração, apesar de uma dieta normal da prole (SABEN et al., 2016). Nesse prisma, a mitocôndria exerce um papel importante na contribuição para o desenvolvimento de síndromes metabólicas.

## 2.4 MITOCÔNDRIA E DINÂMICA MITOCONDRIAL

As atividades da mitocôndria como produtora de energia celular e organela sinalizadora são paralelas pelo fato da existência das duas membranas que formam esta organela. Uma é a membrana mitocondrial interna (MMI) e a outra a membrana mitocondrial externa (MME), caracterizadas por diferentes composições e funções. Enquanto a MMI está mais responsável pela conversão de energia, a MME é a principal plataforma para a sinalização mitocondrial (GIACOMELLO et al., 2020).

Ademais, foram identificadas duas principais consequências funcionais da extrema compartimentalização da MMI. A primeira está relacionada com impactos na bioenergética, uma vez que a organização das cristas mitocondriais, que são invaginações que expandem a área de superfície da mitocôndria e abrigam a maquinaria mitocondrial, garante as condições ótimas para a produção de ATP, na minimização da difusão de metabólitos, prótons e ADP durante a respiração (DEMONGEOT et al., 2007). Consecutivamente, a segunda consequência está atrelada à apoptose. Diante disso, nota-se que a citocromo c é recrutado para o citosol para a ativação das caspases efetoras, sendo liberado da mitocôndria. Assim, durante a morte celular, as cristas passam por mudanças estruturais drásticas, redistribuindo a citocromo c da crista para o espaço intermembrana. Com isso, ocorre sua liberação para o citosol pelos poros apoptóticos presentes na MME. Portanto, deve haver um controle fino na organização da MMI (SCORRANO et al., 2002).

Além disso, o papel da membrana externa (MME) vai além de apenas separar fisicamente ambiente e a organela. Como dito anteriormente, a membrana externa está intensamente associada a eventos de sinalização. Desta maneira, as proteínas localizadas na MME são extremamente relevantes para a mitocôndria e para célula. Nesse prisma, as proteínas pertencentes na MME incluem translocases que medeiam o transporte de outras proteínas precursoras; há também aquelas que interagem com

outros compartimentos subcelulares, em regiões específicas denominadas sítios de contato de membrana; e certas proteínas que coordenam vias de transdução de sinal com a função mitocondrial (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019; KOWALTOWSKI et al., 2019; NEUPERT, 2015; STOJANOVSKI et al., 2012). Por fim, a MME é fundamental para a dinâmica mitocondrial já que é nesta membrana no qual as moléculas envolvidas na fissão e fusão da mitocôndria estão presentes (ZACHARIOUDAKIS et al., 2022).

Posta dessa maneira a questão, os eventos de fusão e fissão são importantes para a regulação da morfologia mitocondrial e na prevenção de doenças (CHEN et al., 2015). Existem inúmeros estudos e revisões expondo a associação de várias doenças humanas com mutações nas moléculas que regulam esses processos dinâmicos. De fato, a fusão mitocondrial é regulada por duas mitofusinas na MME, a MFN1 e MFN2, que são proteínas que pertencem à família relacionada à dinamina das grandes GTPases. Adicionalmente, há também a proteína OPA1, participando também do evento de fusão, sendo localizado na MMI. A MFN1 e MFN2 apresentam um alto grau de homologia e organização estrutural similar (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014; ROJO et al., 2002; TILOKANI et al., 2018). Entretanto, pesquisas nos ramos da genética e bioquímica indicam que estas proteínas possuem funções distintas. Enquanto a MFN1 atua principalmente na reação de fusão junto à OPA1; MFN2, por sua vez, participa da interação compartimentos dentro da célula, com uma função exata na fusão mitocondrial ainda elusiva (CIPOLAT et al., 2004; DE BRITO; SCORRANO, 2008; ISHIHARA; EURA; MIHARA, 2004).

Certamente, a fissão mitocondrial apresenta como um efetor essencial a proteína 1 relacionada à dinamina, conhecida também como DRP1 (SMIRNOVA et al., 2001). Desta forma, esta proteína é translocada do citosol para a MME, ligando-se a receptores, ou ainda chamados de parceiros da MME: o fator de fissão mitocondrial (MFF), proteína de dinâmica mitocondrial de 49 kDa (MID49), MID51 e proteína de fissão mitocondrial 1 (FIS1) (JAMES et al., 2003; LOSÓN et al., 2013; OTERA et al., 2010; PALMER et al., 2011). Assim, após a ligação com esses receptores, ocorre a oligomerização, promovendo a constrição e a fissão mitocondrial (KALIA et al., 2018). Do outro lado, os MERCs, sítios de contato entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático, mostraram-se ser importantes para a troca de lipídios entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019). Adicionalmente, é evidenciado que a perda da homeostase lipídica

nos MERCs leva a uma estrutura mitocondrial anormal, com destaque para cristas encurtadas e hiperfusão mitocondrial, guiando para a disfunção da respiração mitocondrial e senescência prematura (JANER et al., 2016).

## 2.5 INTERAÇÃO MITOCÔNDRIA – RE

A interação entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático é um dos tipos de contato entre membranas mais bem revisadas e estudadas. As membranas do retículo endoplasmático estão conectadas às mitocôndrias por meio de pontes proteicas, que estabelecem sítios de contato entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (RE), abreviados por MERCs, do inglês “mitochondria-ER contact sites”. A molécula chave para a conexão nos MERCs é a MFN2, que está localizada tanto no retículo endoplasmático quanto na MME, sendo essa interação entre a MFN2 da mitocôndria com a do RE ou ainda entre a MFN1 da mitocôndria com a MFN2, uma certa classe de afinidade heterotípica (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019, KOWALTOWSKI et al., 2019). Destaca-se ainda na associação entre as duas organelas a proteína VAPB do RE com a PTP51 na MME (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019). Ainda, há estudos indicando que a dinâmica espacial de ambas organelas está acoplada e depende de microtúbulos acetilados (FRIEDMAN et al., 2010).

Especialmente, a fissão mitocondrial ocorre em locais próximos do RE liso, que envolve as mitocôndrias. Nesses sítios de contato, a DRP1 atua junto com as proteínas nucleadoras de actina INF2 e a proteína ligadora de formina Spire 1C, causando o acúmulo de actina que precede o recrutamento da DRP1 para o sítio de fissão. Em adição, o acúmulo de filamento de actina pode direcionar para a constrição mitocondrial inicial, auxiliando na polimerização subsequente da DRP1 (KOROBOVA; RAMABHADRAN; HIGGS, 2013; MANOR et al., 2015). Além disso, os MERCs permitem também a transferência de  $Ca^{2+}$  para mitocôndria, que conduz para a apoptose e ainda ativa a constrição da MMI independente de DRP1 para completar a fissão mitocondrial (CHAKRABARTI et al., 2017).

Assim, a interação entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático é extremamente importante para o equilíbrio dentro das células, em que mudanças nesses sítios de contato levam a alterações do metabolismo, sendo muitas vezes relacionadas com síndromes metabólicas, como a obesidade, diabetes e doenças

cardiovasculares (BENADOR et al., 2019; GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019; KLECKER; BÖCKLER; WESTERMANN, 2014; VALM et al., 2017; ZORZANO et al., 2015). Diante disso, os MERCs garantem que sejam regulados processos como a apoptose, a sinalização intracelular de  $Ca^{2+}$ , a troca de lipídeos, a autofagia e a própria dinâmica mitocondrial (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019; LIESA; SHIRIHAI, 2013; SCHREPFER; SCORRANO, 2016; ZORZANO et al., 2015). Para tal, a MFN2 participa ativamente nesse contato entre as duas organelas, sendo sua ausência ou déficit relacionada com perturbações na homeostase celular, com aumento do estresse do retículo endoplasmático.

Além disso, com um contato mais brando nos MERCs, ocasiona-se distúrbios nas funções mitocondriais, reduzindo também a flexibilidade metabólica, causando um aumento de lipídeos nos tecidos onde a MFN2 é mais expressa, como o músculo estriado esquelético. Como resultado, há aumento da taxa de produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de fatores estimulados por estresse, como a JNK e uma resposta inadequada à insulina (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019; LIESA; SHIRIHAI, 2013; ZORZANO et al., 2015).

## 2.6 ENDEREÇAMENTO DAS PROTEÍNAS PARA A MITOCÔNDRIA

De início, nota-se que grande parte das proteínas precursoras das mitocôndrias são importadas de uma maneira pós-traducional. Assim, elas devem se manter sem ou com poucos dobramentos, permitindo sua passagem pelos poros da membrana. Dessa forma, uma das principais formas de mantê-las estáveis são as chaperonas citosólicas. Conhecidas como Hsp90/p23 e Hsc70/Hsp40 (BHANGOO et al., 2007; YOUNG; HOOGENRAAD; HARTL, 2003; ZARA et al., 2009). Percebe-se que algumas proteínas precursoras ainda podem estar sendo traduzidas durante a importação à mitocôndria. Com isso, o mRNA destinado para a mitocôndria permite que processos pós-transcricionais auxiliem a maquinaria de importação mitocondrial, permitindo respostas rápidas a mudanças do metabolismo ou no estímulo celular (DEVAUX et al., 2010).

Diante disso, destaca-se a sinalização para que o destino seja alguma organela. No caso da mitocôndria, existem sequências de resíduos de aminoácidos na proteína precursora que medeia sua destinação para a mitocôndria. Elas podem ser de duas classes: a pré-sequência amino-terminal clivável ou ainda sinais de

importação internos não cliváveis (VÖGTLE et al., 2009). Dessa forma, proteínas precursoras que possuem a pré-sequência e que direcionam para a matriz mitocondrial ou para a membrana interna possuem seu sinal amino-terminal clivado por peptidases, como a MPP, Oct1 e Icp55. Além disso, a inserção destas proteínas em cada membrana ou na matriz mitocondrial dependem de três principais maquinarias de translocação, o TOM, o TIM22 e TIM23 (NAAMATI et al., 2009; TAYLOR et al., 2001; VÖGTLE et al., 2009, 2011).

O primeiro complexo, o TOM (“Translocase of the outer membrane”), é responsável pela importação geral das proteínas precursoras codificadas no núcleo. Esse complexo translocador transfere as proteínas pela membrana externa (MME), transportando-as para o espaço intermembrana ou ainda inseridas na MME com auxílio de um complexo denominado SAM (“Sorting and assembly machinery”) que contribui no dobramento apropriado da proteína na MME. Já o complexo TIM22 e TIM23 atuam na transferência das proteínas precursoras no espaço intermembrana da mitocôndria para a matriz mitocondrial. Ademais, participam da inserção dessas proteínas na membrana interna mitocondrial (MMI). Em específico, o complexo TIM22 está relacionada com a inserção de uma classe de proteínas, as quais incluem proteínas transportadoras de ADP, ATP e fosfato no fluxo bidirecional entre a mitocôndria e o citosol, além de outros elementos que estruturam vias de translocação (ALBERTS, 2017; NEUPERT, 2015; STOJANOVSKI et al., 2012).

Por fim, há ainda um terceiro translocador relevante na MMI, chamado complexo OXA, que direciona a inserção de proteínas na membrana que são produzidas pela mitocôndria. Em adição, o mesmo ainda assiste na incorporação na MMI daquelas proteínas que são primeiramente transportadas para a matriz mitocondrial (ALBERTS, 2017).

## 2.7 PAPEL DA MITOFUSINA 2

Existem duas proteínas homólogas conservadas, a Mitofusina 1 e a Mitofusina 2, estas são transmembranares e estão principalmente expostas para o citosol (ZORZANO; PICH, 2006). Além disso, possuem um domínio GTPase na região N-terminal e dois domínios de repetição heptádicos hidrofóbicos que estão separados por uma âncora transmembrana, sendo codificado no DNA nuclear (CAO et al., 2017; DASTE et al., 2018; HALES; FULLER, 1997; LI et al., 2019; LOW et al., 2009; MATTIE

et al., 2017; QI et al., 2016; ROJO et al., 2002; YAN et al., 2018). Apesar de serem homólogas, apresentam níveis de expressão distintos de acordo com o tecido. A MFN1 está mais presente no testículo, enquanto a MFN2 está predominante no cérebro, no coração, no tecido adiposo marrom e no tecido muscular esquelético, ainda que a expressão seja ubíqua de ambas. Nos outros tecidos, os níveis de expressão são semelhantes (EMERY; ORTIZ, 2021; EURA et al., 2003; SANTEL et al., 2003).

Embora as duas mitofusinas regulem a fusão entre as mitocôndrias, especificamente da membrana externa, de forma homotípica (MFN2 – MFN2 ou MFN1 – MFN1) ou heterotípica (MFN1 – MFN2), algumas funções adicionais foram atribuídas para a mitofusina 2. Esta última participa da regulação do contato e a distância entre a mitocôndria e o RE, controlando o fluxo de  $Ca^{2+}$  entre estas organelas (CHEN; CHAN, 2017; COSSON et al., 2012; DE BRITO; SCORRANO, 2008; DORN, 2020; FILADI et al., 2015; FILADI; PENDIN; PIZZO, 2018; GÖBEL et al., 2020; MATTIE; KROLS; MCBRIDE, 2019; NAON et al., 2016; RIZZUTO et al., 1998; SZABADKAI et al., 2006; ZHU et al., 2017). Adicionalmente, esses sítios de contatos são relevantes para a transferência de fosfolípidos entre as duas organelas, sendo sugerido um papel direto da MFN2 na transferência de lipídeos (HERNÁNDEZ-ALVAREZ et al., 2019).

Dessa forma, a mitofusina 2 foi ligada aos processos desde mitofagia até apoptose (BROOKS et al., 2007; GEGG et al., 2010; HOPPINS et al., 2011; KARBOWSKI et al., 2002; POOLE et al., 2010; ZIVIANI; TAO; WHITWORTH, 2010). Igualmente, essa proteína vem sendo atrelada a outras inúmeras funções no metabolismo, o que é evidenciado pelo seu envolvimento em síndromes metabólicas, como a obesidade e diabetes (BACH et al., 2005; BELL et al., 2019; BOUTANT et al., 2017; RAMÍREZ et al., 2017; SCHNEEBERGER et al., 2013; SEBASTIÁN et al., 2012; TOLEDO; WATKINS; KELLEY, 2006). Ademais, a depleção desta enzima induz um estado de baixo potencial da membrana mitocondrial, a redução na taxa de consumo de oxigênio e do vazamento de prótons, o que prejudica a oxidação da glicose, piruvato e ácidos graxos (BACH et al., 2003; CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005; MOURIER et al., 2015; PICH et al., 2005). Vale destacar, ainda, que a perda da sua atividade reprime subunidades codificadas pelo núcleo que são integrados aos complexos I, II, III e V no processo da fosforilação oxidativa, independente da sua atividade fusogênica (MOURIER et al., 2015; PICH et al., 2005).

Diante aos fatos expostos, esse trabalho buscou elucidar os mecanismos e alterações relacionadas com a herdabilidade mitocondrial e os efeitos maternos no tecido cardíaco, a partir da transmissão de mitocôndrias de mães obesas com a inativação da expressão da MFN2 no oócito, estudando uma possível interação entre a obesidade materna e o nocaute da MFN2 no oócito. Averiguou-se, portanto, alterações nas funções mitocondriais, do retículo endoplasmático e do sítio de contato das duas organelas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar alterações da transcriptômica e da morfologia mitocondrial do tecido cardíaco na progênie de fêmeas obesas nocaute-oócito específico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os transcritos associados com os efeitos na progênie no tecido cardíaco utilizando RNA-Seq;
- Realizar análises de enriquecimento das amostras de RNA sequenciadas do tecido cardíaco coletado da progênie;
- Mapear e interpretar dos resultados de genes diferencialmente expressos entre as progênies de fêmeas KO e WT obesas, e entre os filhotes de mães KO e WT que consomem ração NFD.
- Elucidar as alterações transcricionais na progênie do tecido cardíaco de filhotes descendentes de fêmeas MFN2 KO obesas;
- Determinar os efeitos mitocondriais associados com a área, perímetro e razão entre os diâmetros maior e menor das mitocôndrias do tecido cardíaco da progênie de mães MFN2 KO obesas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

A manutenção dos camundongos foi realizada seguindo o proposto pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA, com os animais mantidos a uma temperatura de 22° C, durante um período de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Com exceção se especificado, os animais tiveram acesso à água e ração à vontade,. Camundongos *Mfn2 floxed* da linhagem STOCK *Mfn2tmDcc/Mmcd* (CHEN et al., 2010) foram anteriormente adquiridos da Mutant Regional Resource Centers (RRID:MMRRC\_029902-UCD), enquanto animais transgênicos para a *Zp3-Cre* da linhagem C57BL/6-Tg(*Zp3-cre*)93K<sup>knw</sup>/J (DE VRIES et al., 2000) foram obtidos da Jackson Laboratories (RRID:IMSR\_JAX:003651). Vale destacar que uma mutação de ocorrência natural no gene *Nnt* foi anteriormente eliminada dos animais.

Fêmeas WT (*Zp3-CRE:Mfn2<sup>Δ/+</sup>*) e MFN2 KO (*Zp3-CRE:Mfn2<sup>Δ/fl</sup>*) foram obtidas por acasalamento de fêmeas *Zp3-CRE:Mfn2<sup>Δ/+</sup>* com machos *Zp3-Cre:Mfn2<sup>fl/+</sup>*; *Mfn2<sup>+</sup>*, *Mfn2<sup>Δ</sup>* e *Mfn2<sup>fl</sup>* representam, respectivamente, os alelos selvagem, deletado e floxed. A expressão “CRE” nos oócitos de fêmeas MFN2 KO resulta na recombinação oócito-específica do alelo *Mfn2<sup>fl</sup>* durante a fase de crescimento do gameta (DE VRIES et al., 2000). A partir da sexta semana de vida, as fêmeas WT e MFN2 KO receberam por 12 semanas ração HFD com 58,6% das calorias provenientes de lipídeos, 26,4% oriundas de carboidratos e 15,0% de fontes proteicas. Como controle, fêmeas WT e MFN2 KO foram alimentadas com a ração NFD, onde 9,4% do total são provenientes de lipídeos, 21,1% de proteínas e 69,6% de carboidratos. Conforme foi já estabelecido pelo nosso grupo, o oferecimento de HFD por 12 semanas resulta em obesidade e intolerância à glicose. Fêmeas em pró-estro ou estro foram acasaladas por 24 horas com machos selvagens C57BL/6J com 11-40 semanas de idade, mantidos com ração NFD. Após o acasalamento, as fêmeas continuaram sendo mantidas com a ração oferecida anteriormente ao acasalamento, enquanto os machos eram alimentados ainda com a dieta NFD somente. Pelo menos três fêmeas de cada grupo experimental reproduziram duas vezes, com mínimo de três filhotes do genótipo *Zp3-CRE:Mfn2<sup>Δ/+</sup>*, sendo utilizados em análises depois de dez semanas de vida completadas.

### 4.2 GENOTIPAGEM

Para realizar a genotipagem dos animais, foi utilizada uma biópsia auricular coletada entre 7-9 dias de vida. Esta foi digerida por 3 horas à 65° C em 200 µL de solução com 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/mL gelatina, 0,45% Igepal CA-630, 0,45% Tween 20 e 125 µg/mL proteinase K. Em seguida, houve a inativação da proteinase K, incubando a solução à 95° C por 20 minutos, sendo a amostra posteriormente centrifugada a uma rotação de 10.000xg por 5 minutos e o sobrenadante utilizado para a genotipagem. Os alelos *Mfn2*<sup>+</sup>, *Mfn2*<sup>Δ</sup> e *Mfn2*<sup>fl</sup>, assim como a presença da transgene *Zp3-CRE*, foram determinadas por PCR convencional, com as amplificações corridas em gel de agarose 2%, tratados com “SYBR Safe”. Assim, a revelação do gel foi feita no equipamento Chemidoc Bio-Rad.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com o acasalamento de fêmeas WT ou KO MFN2 com machos selvagens, houve a formação de dois grupos experimentais por tipo de dieta de acordo com a origem da progênie (Figura 1). Assim, as análises de transcriptoma e de microscopia são comparadas entre genótipos em uma mesma dieta. Dessa maneira, temos a comparação entre os grupos experimentais F1 KO HFD x F1 WT HFD ou F1 KO NFD x F1 WT NFD, em que todos filhotes F1 usados apresentam o genótipo *Zp3-CRE:Mfn2*<sup>+ / Δ</sup>.

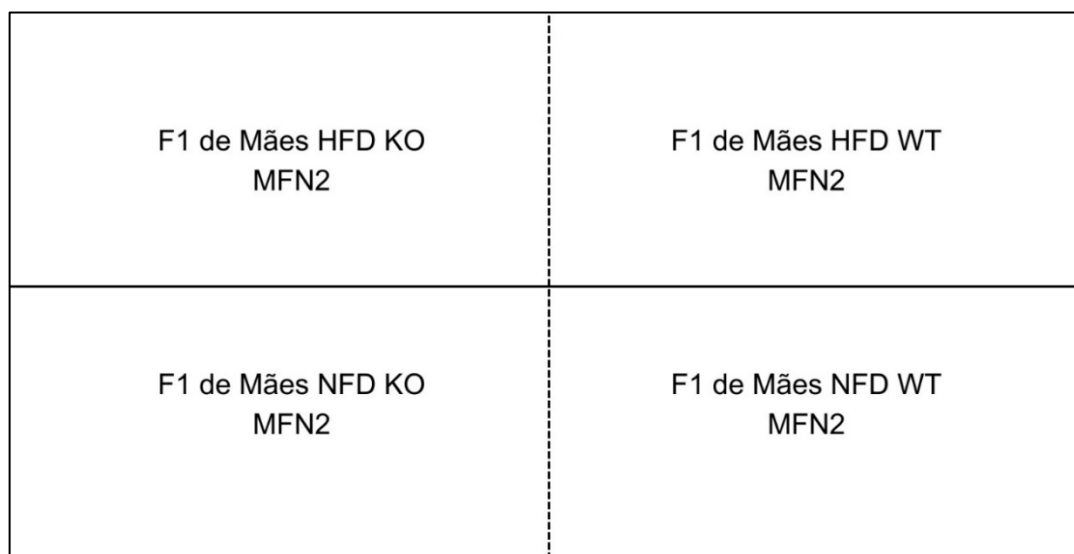


Figura 1 - Esquematização dos grupos experimentais.

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A densidade e morfologia mitocondrial foram analisados utilizando um microscópio eletrônico de transmissão. Para tanto, fragmentos do tecido cardíaco que foram coletados no sentido longitudinal após sacrifício dos animais que possuíam dieta HFD, sendo lavados em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,3) com 3 mM de CaCl<sub>2</sub>, seguido de incubação por 4 horas à 4° C em tampão cacodilato 0,01 M acrescido de 3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído. Em seguida, foram pós-fixados por 1 hora em 2% de tetróxido de ósmio à 4° C e desidratado em concentrações crescentes de etanol. O tecido foi emblocado em resina epóxi, cortando em secções ultra-finas e corado com acetato de uranila e citrato de chumbo. Para a análise foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão com aumento de 5 a 100 kV, MET JEM 100CXII da JEOL, equipado com uma câmera digital ORCA-HR. As mitocôndrias foram analisadas por determinação do número, área, perímetro e a razão entre o diâmetro maior e menor (AR) utilizando o software ImageJ, com a seleção randomizada das mitocôndrias das imagens analisadas entre os grupos F1 KO e F1 WT da dieta HFD somente.

#### 4.5 RNA-SEQ

De início, o tecido cardíaco foi coletado de animais de experimento e transferido para microtubos de 2 mL com solução fisiológica e armazenado em freezer -80° C. Em seguida, com o uso de nitrogênio líquido, o tecido foi macerado para posterior extração do RNA total utilizando o Rneasy Mini Kit (Qiagen). Com as amostras de RNA total obtidas, foi realizado a preparação das bibliotecas de sequenciamento, consistindo da purificação e enriquecimento do RNA, selecionando o mRNA a partir da seleção poli-A. Após essa etapa, partiu-se para a fase de fragmentação e conversão das amostras de RNA em cDNA. Com a síntese das duas fitas do cDNA, há a adição de uma adenina à extremidade 3', prevenindo ligações indesejadas durante a reação de ligação dos adaptadores. Logo depois, há a integração de adaptadores às extremidades do cDNA, garantindo que o fragmento de DNA que será sequenciado anexe-se à "flow cell", onde as reações de sequenciamento acontecem. Portanto, os adaptadores permitem os sequenciadores reconhecerem e

sequenciarem as amostras de cDNA. Em suma, o RNA total foi utilizado para o preparo das bibliotecas de sequenciamento com o auxílio do TruSeq Stranded mRNA (Illumina) (Figura 2). Após, as bibliotecas foram então quantificadas em Qubit (ThermoFisher Scientific) e analisadas quanto ao tamanho em Bioanalyzer (Agilent). O sequenciamento, dividido nas etapas de amplificação do material e do sequenciamento propriamente dito, foi realizado no equipamento NextSeq 550, da Illumina, considerando “reads” de 75 pb.

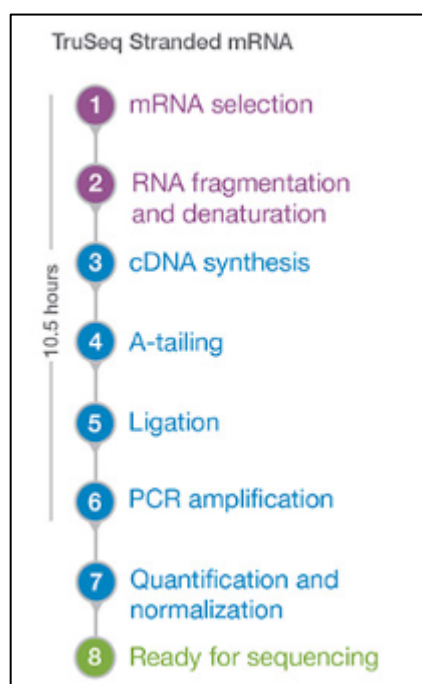


Figura 2 - “Workflow” TruSeq Stranded mRNA.

Fonte: retirado da página do produto da Illumina.

Uma vez sequenciado, os sequenciadores gerarão dados brutos, que serão avaliados quanto a qualidade das “reads” ou leituras, buscando possíveis contaminantes, além da identificação das amostras com baixa performance de sequenciamento. Passada a etapa de qualidade, as leituras foram processadas, realizando cortes e ajustes necessários nas leituras, retirando as sequências dos adaptadores e realizar a manutenção de sequências de baixa qualidade e tamanho mínimo. Por fim, as leituras foram alinhadas com o genoma de referência (*Mus musculus*), para o mapeamento, quantificação e normalização das leituras (RPKM, TPM e CPM).

Com a contagem das leituras mapeadas, foi realizada análises de expressão diferencial entre os grupos F1 KO MFN2 e F1 WT, alinhados a mães com dieta HFD ou NFD. Com isso, foram realizadas verificações quanto ao número de genes diferencialmente expressos (regulados positivamente e negativamente), o agrupamento dos indivíduos quanto aos genes diferencialmente expressos, aos genes significativos diferencialmente expressos e o padrão de expressão entre os animais em estudo. Adiante, o enriquecimento de vias foi realizado com o uso da plataforma online DAVID, fornecendo um conjunto de ferramentas de anotação funcional para investigar a relação entre os genes que estavam diferencialmente expressos, além de mapas de vias hospedadas no KEGG, relevantes para o destaque de genes que apresentaram diferença de expressão entre a progênie de fêmeas KO MFN2 e WT. Assim, até os procedimentos de mapeamento da leitura foram realizados utilizando a plataforma de análise de bioinformática hospedado pela QIAGEN.

#### 4.6 ANÁLISE DE DADOS

Foram utilizados 4 animais por grupo experimental, os quais descenderam de progenitoras diferentes. As análises de bioinformática e estatística dos dados do transcriptoma foram realizadas, em suma, mapeando as “reads” (>10 milhões “reads”/amostra), tendo como referência o genoma murino. Assim, os genes com expressão diferencial foram determinados e destacados por meio do programa Rstudio, importando o pacote DESEQ2, considerando o método Benjamini-Hochberg ( $FDR < 0,1$ ) e  $\log_2$  “fold-change” maior que 1,1 ou menor que -1,1. A visualização e sumarização das informações se deu pela produção de gráficos de dispersão, “heatmaps” e “biplots” a partir da PCA. As análises de enriquecimento foram realizadas utilizando o pacote ClusterProfiler do R, incluindo o pacote biomaRt, tidyverse, dplyr e pathview. Para a produção de mapa das vias, foi utilizado diagramas disponibilizados pelo banco de dados do KEGG, uma coleção de banco de dados que ajuda a entender funções e utilidades de alto nível do sistema biológico. Para as análises de microscopia, foi usado o teste t, seguindo as premissas de normalidade das observações da área, perímetro e AR das mitocôndrias ou, ainda, teste não-paramétricos caso não se siga a distribuição normal das observações.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TRANSCRIPTOMA DO TECIDO CARDÍACO

Para a quantificação de genes diferencialmente expressos, foram produzidos gráficos de dispersão (Gráficos 1 e 2). No gráfico 1, nota-se um grande número de genes que estavam diferencialmente expressos entre os grupos dentro da dieta HFD. Nessa comparação entre F1 KO MFN2 e F1 WT, 1975 genes estavam positivamente regulados. Ainda, 2174 genes estavam negativamente regulados, demonstrando uma profunda alteração transcriptômica entre os grupos experimentais.

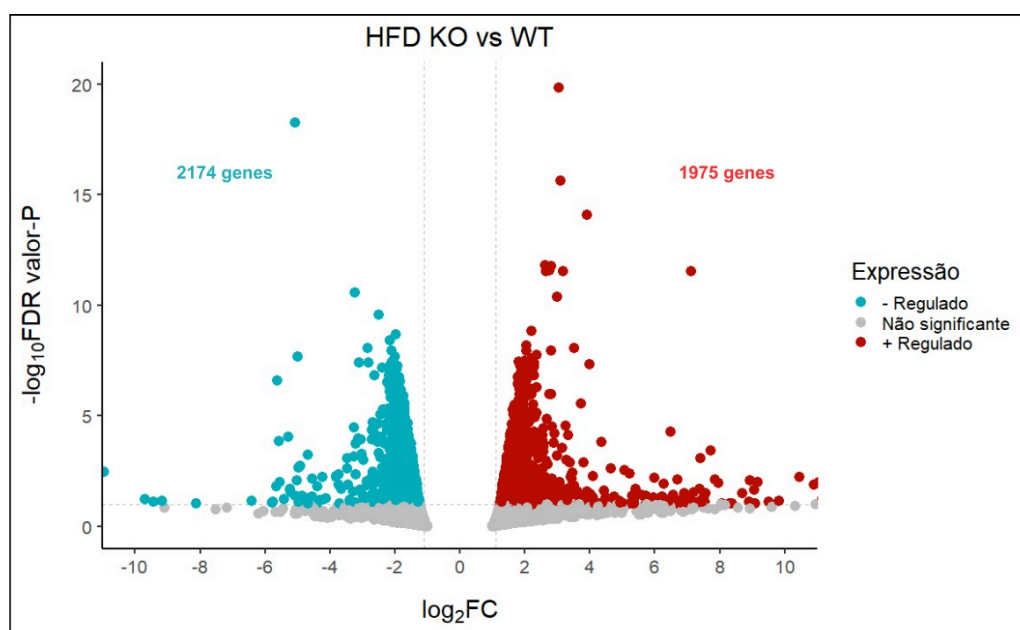


Gráfico 1 - Gráfico de dispersão, F1 KO vs F1 WT, dieta HFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

Já para a dieta NFD (Gráfico 2), o número de genes diferencialmente expressos foi menor, com 299 genes positivamente regulados. Além, foram 168 genes que estavam negativamente regulados na comparação da expressão entre F1 KO MFN2 e F1 WT no tecido cardíaco.

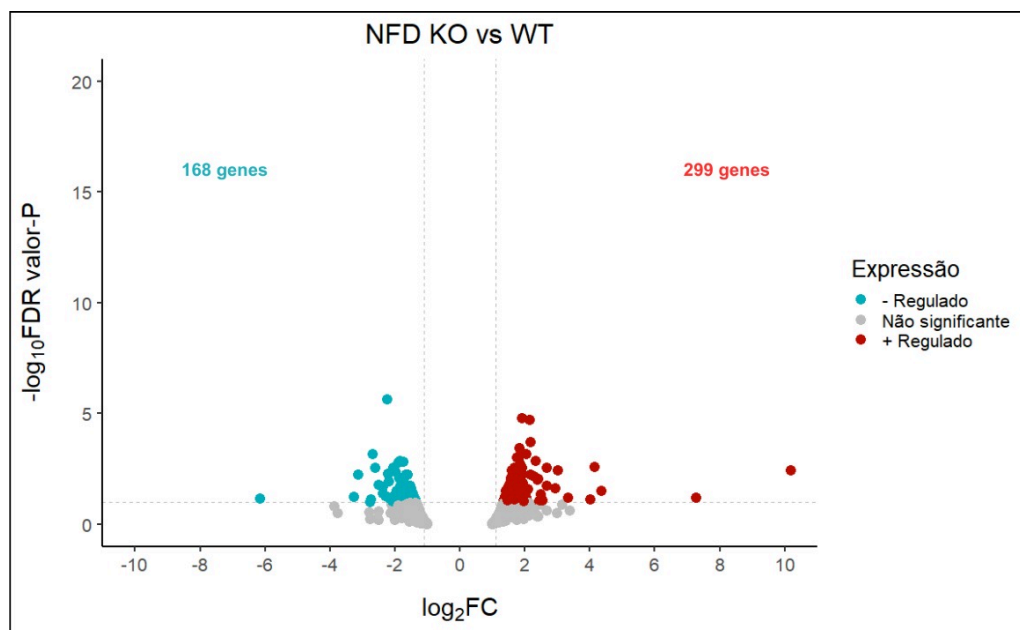


Gráfico 2 - Gráfico de dispersão, F1 KO vs F1 WT, dieta NFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

Já para a expressão de cada indivíduo, observa-se um conjunto de genes que estão diferencialmente expressos no tecido cardíaco para os indivíduos do grupo F1 KO MFN2 em relação ao grupo F1 WT à nível de éxons, determinando diferenças de expressão entre esses grupos experimentais, como valores de z-scores próximos entre indivíduos do mesmo grupo e pontuações distintas em relação ao outro grupo experimental em geral (Figura 3 e 4). Interessantemente, o gene *Mfn2* não está diferencialmente expresso significativamente entre os grupos experimentais, tanto para o HFD quanto para NFD (FDR valor-PHFD = 0,24495; FDR valor-PNFD = 0,193927).

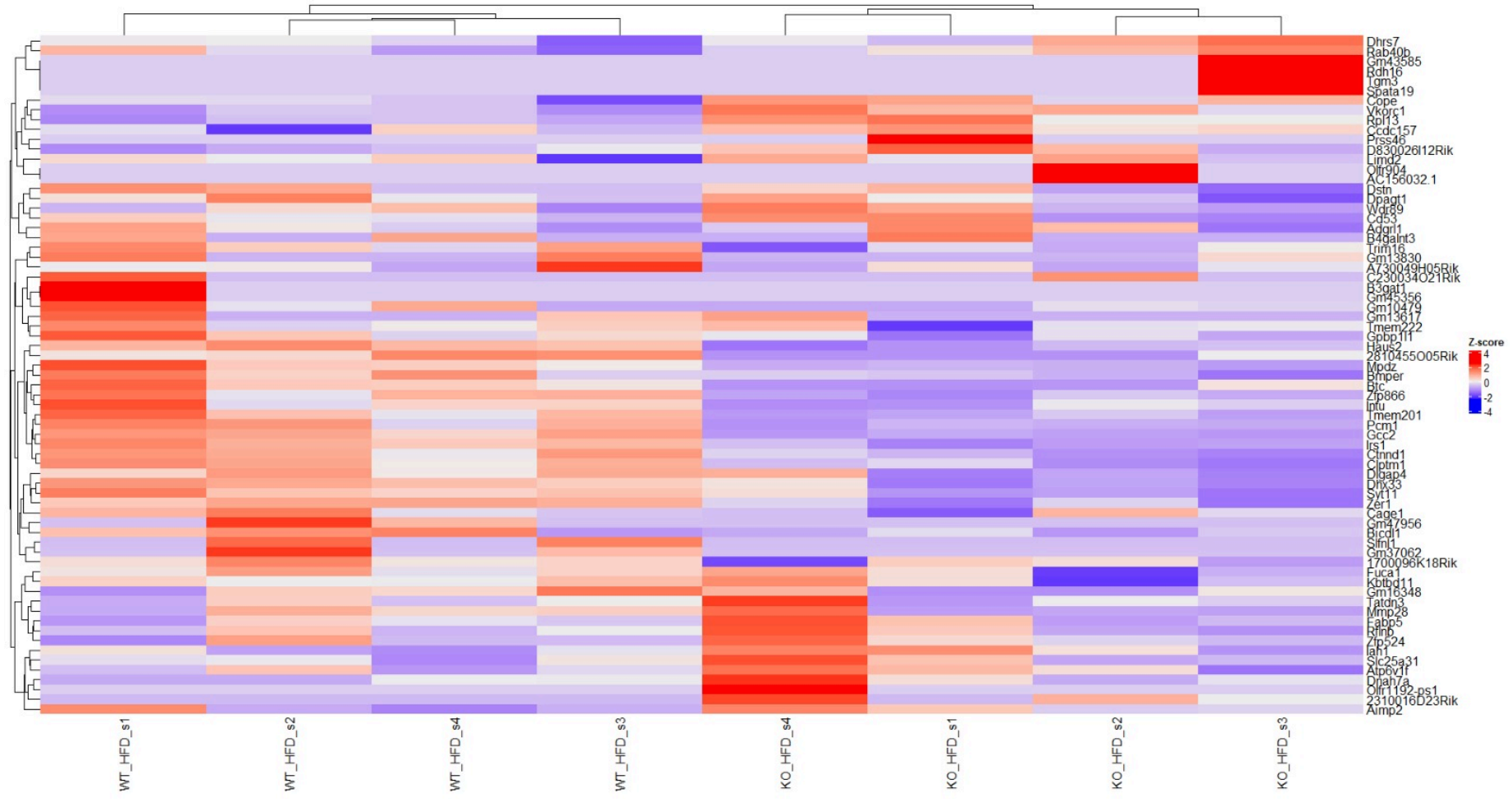


Figura 3 - "Heatmap" F1 KO vs F1 WT, dieta HFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

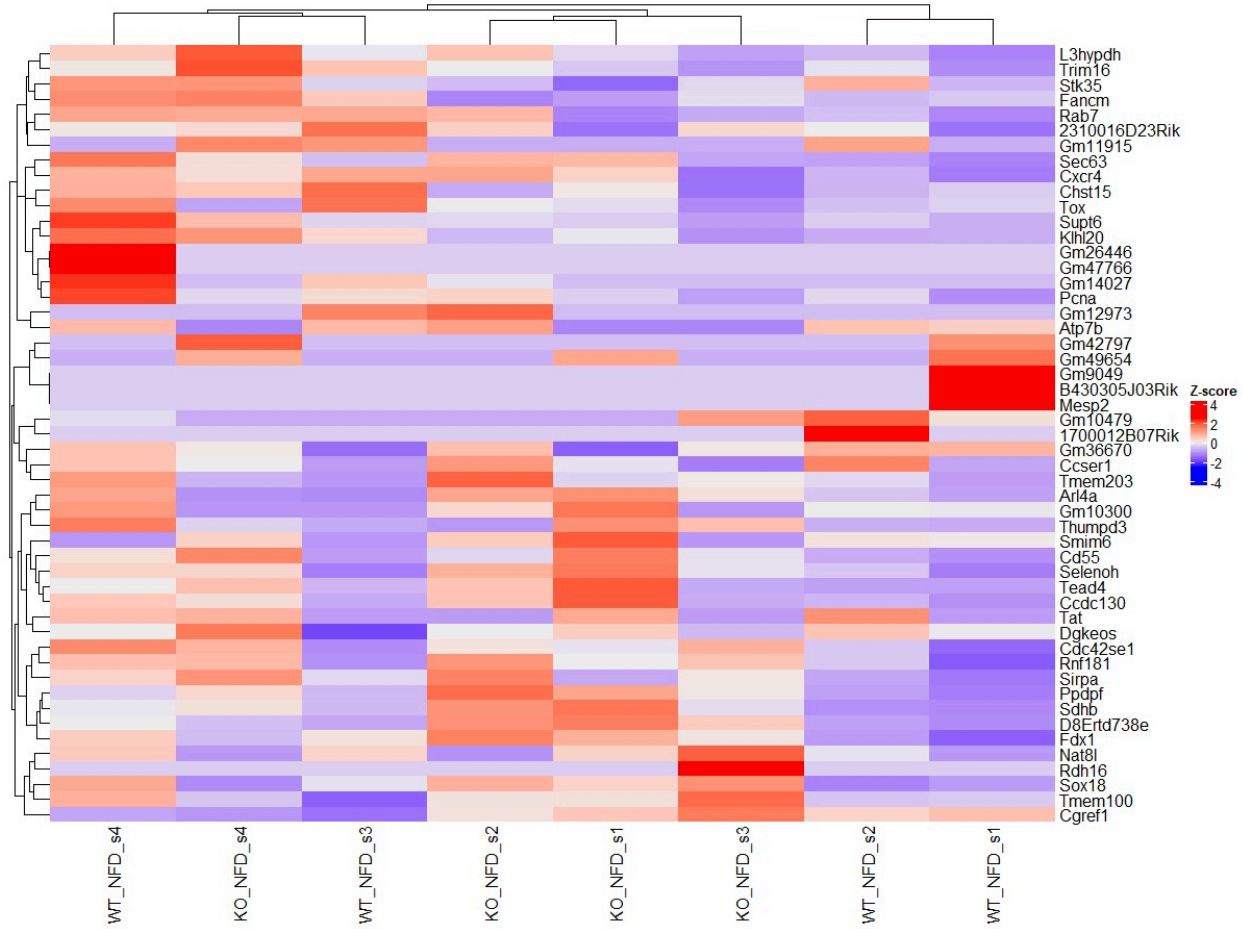


Figura 4 - "Heatmap", F1 KO vs F1 WT, dieta NFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

Para visualização e análise, foi utilizado a análise do componente principal (PCA), um procedimento estatístico para sumarizar e organizar a informação da expressão à nível de éxon dos grupos experimentais. Como observado no gráfico 3, dentro da dieta HFD os grupos experimentais agrupamentos relevantes em torno do primeiro componente principal (eixo das abcissas). Já para a dieta NFD (Gráfico 4), a agregação e distinção das observações de cada grupo foi menos evidente, tanto para o primeiro componente principal (eixo das abcissas) quanto para o segundo componente principal das análises de PCA (eixo das ordenadas).

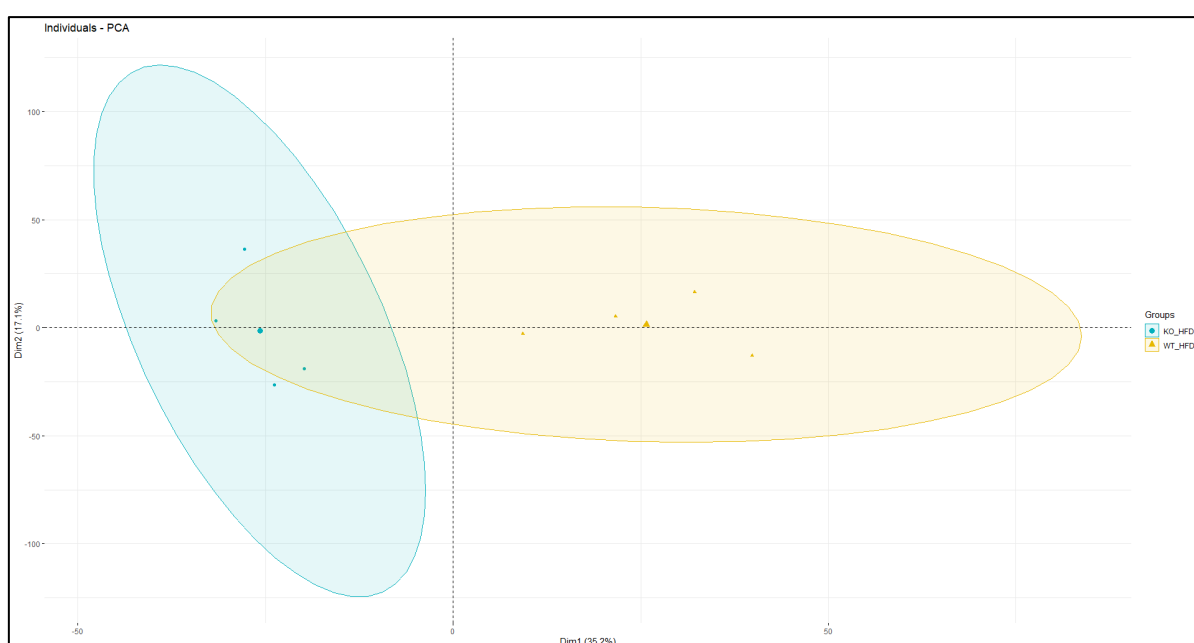


Gráfico 3 - Plano das duas principais componentes, dieta HFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

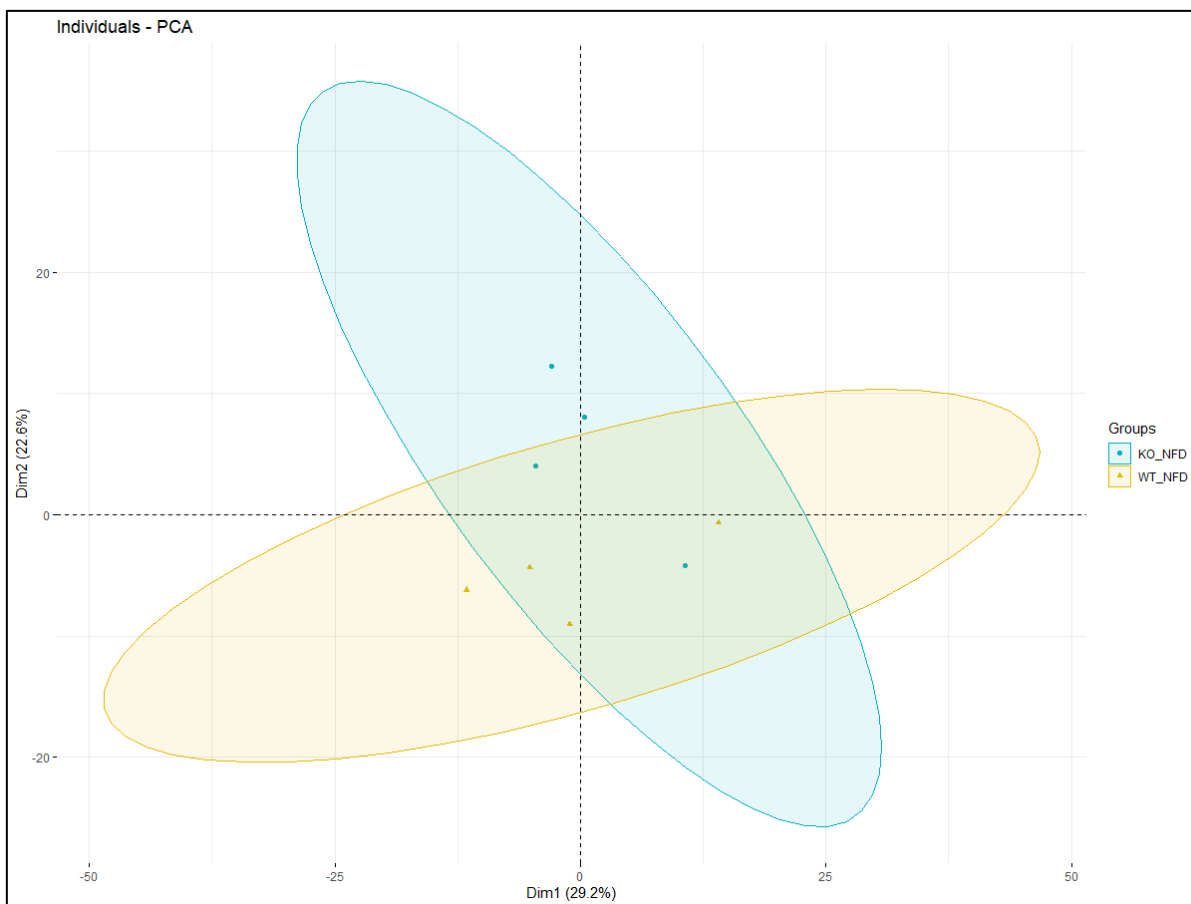


Gráfico 4 - Plano das duas principais componentes, dieta NFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

Em vista disso, nota-se inúmeras vias enriquecidas para os genes diferencialmente expressos para a comparação F1 KO MFN2 HFD x F1 WT HFD. Entretanto, muitas informações de vias enriquecidas acabam se tornando redundantes, uma vez que mesmos genes diferencialmente expressos podem participar de múltiplas vias, sendo muitas vias organizadas de maneiras hierárquicas, como sinalização de insulina e diabetes. Uma maneira de superar esse obstáculo está no mapeamento de enriquecimento, que auxilia na visualização e na interpretação dos resultados das análises de vias enriquecidas de nosso interesse.

Realizado o enriquecimento das vias, nota-se uma grande variedade de vias de diferencialmente expressas entre o grupo selvagem e nocaute para a MFN2 para fêmeas que consumiam a ração HFD (Gráfico 5). Dentre todas vias, destacou-se, dentro do contexto apresentado, a via relacionada com cardiomiopatia diabética e a fosforilação oxidativa. Para o primeiro, foram identificados 105 genes que estavam diferencialmente expressos entre os grupos F1 KO MFN2 HFD e F1 WT HFD, com

um valor de FDR de  $3,2344 \times 10^{-20}$ , demonstrando ser uma via enriquecida significativa. Dessa forma, interpreta-se a relevância das condições submetidas para a obtenção desse resultado. Além disso, para a segunda a via, participaram 81 genes com a expressão diferente entre os grupos expostos, com o valor de FDR de  $9,5741 \times 10^{-22}$ , indicando alterações transcricionais na respiração nas células do tecido cardíaco.

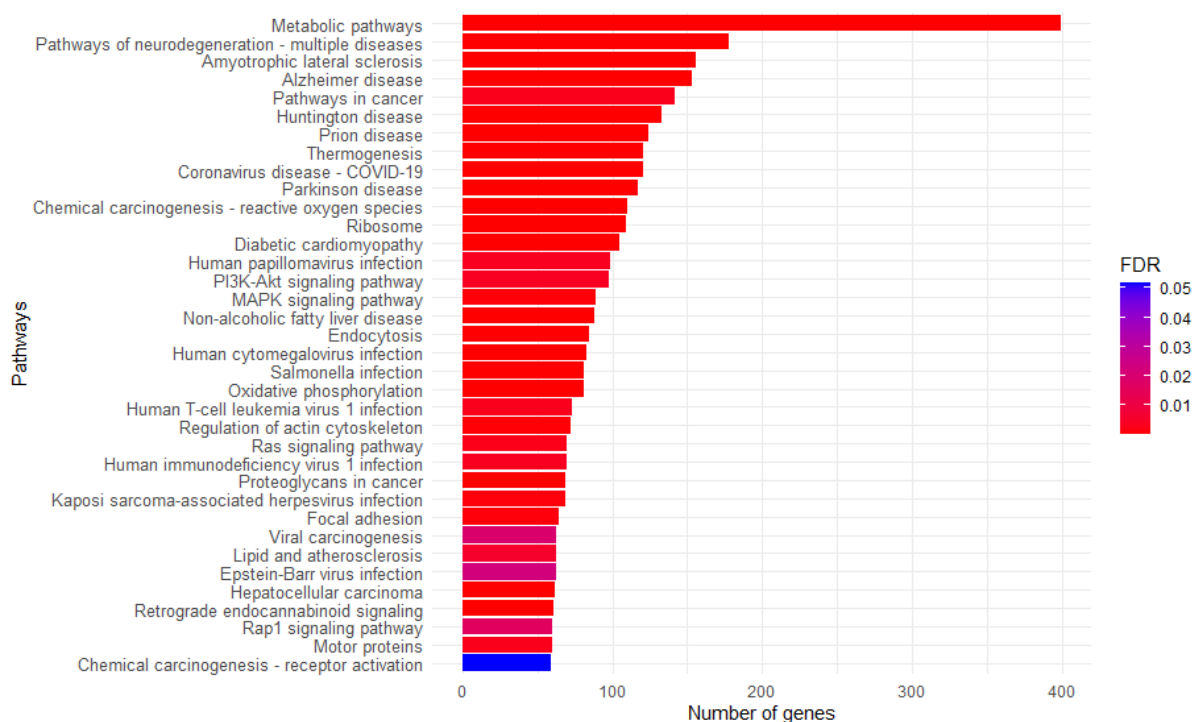


Gráfico 5 - Gráfico de barras para as vias enriquecidas para DEGs F1 KO x F1 WT, dieta HFD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionalmente, quando comparado a expressão diferencial de genes entre os grupos F1 KO MFN2 NFD e F1 WT NFD, foram obtidas uma menor quantidade de vias enriquecidas. Entretanto, houve também alterações nas vias relacionadas com a cardiomiopatia diabética e na fosforilação oxidativa. Para aquela via, participaram 17 genes, com um valor de FDR de  $2,3711 \times 10^{-3}$ . Já para a via enriquecida na fosforilação oxidativa, houve uma diferença de expressão de 16 genes, com um valor de FDR de  $8,2728 \times 10^{-5}$ , indicando uma mudança significativa nessa via (Gráfico 6).

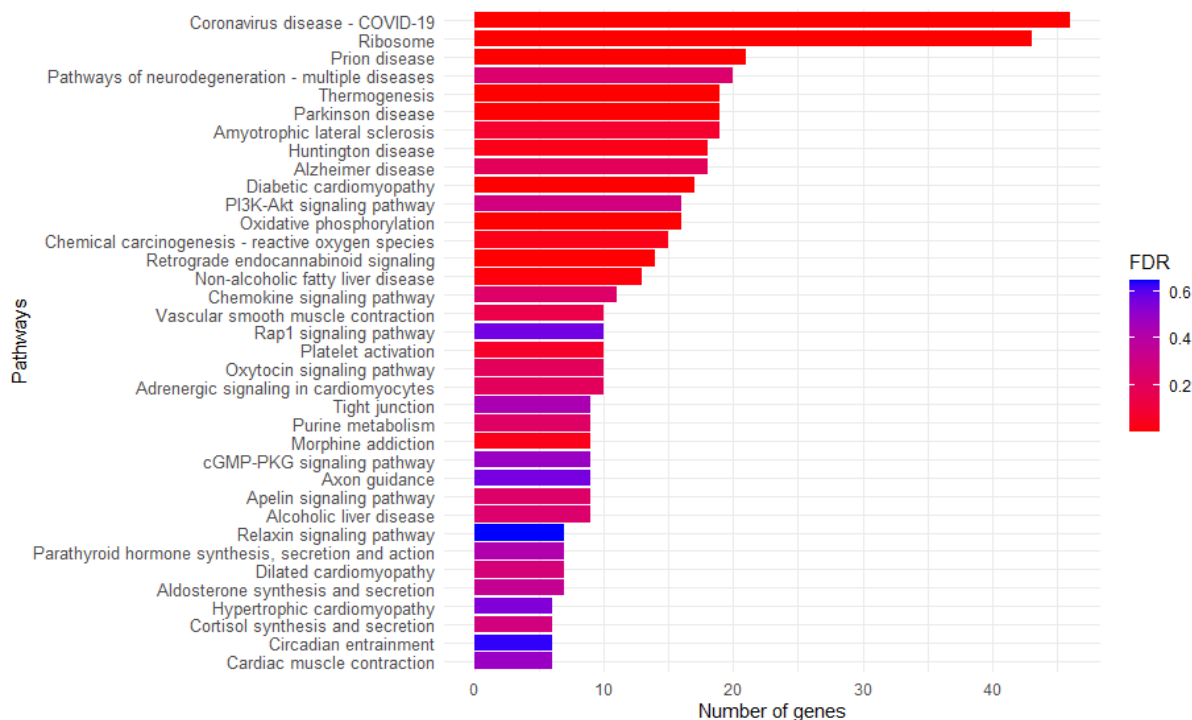


Gráfico 6 - Gráfico de barras para as vias enriquecidas para DEGs F1 KO x F1 WT, dieta NFD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, foi utilizado o pacote “Pathview” do R para o mapeamento de módulo expressos diferencialmente para cada via enriquecida. Para a expressão diferencial entre os filhotes originados de fêmeas KO MFN2 vs WT que consomem ração HFD, nota-se uma mudança geral na expressão das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Figura 5). Adicionalmente, quando se compara a progênie de fêmeas KO/NFD com as WT/NFD, ocorre alterações na expressão de cadeias polipeptídicas dos complexos (Figura 6). Dessa maneira, nota-se um efeito brando em relação às progênie de fêmeas com dieta HFD.

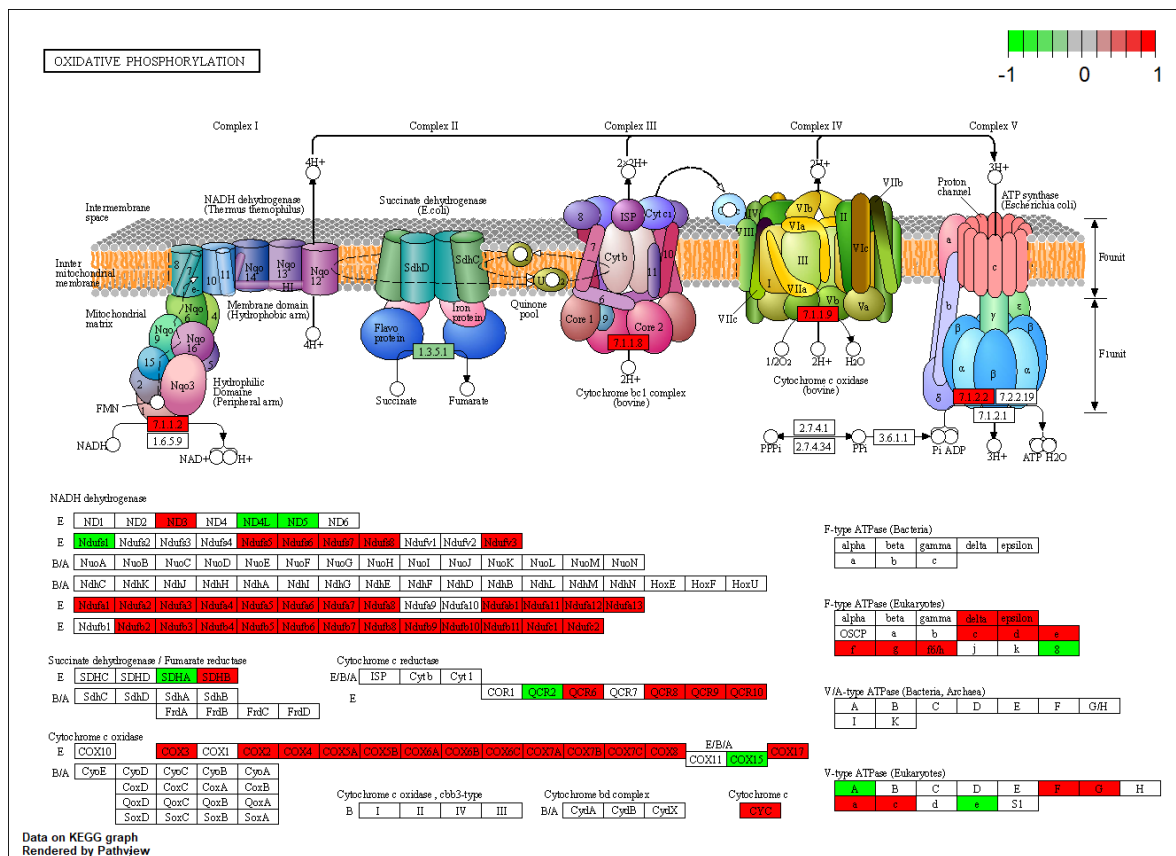


Figura 5 - Mapa de via: Fosforilação Oxidativa, F1 KO x F1 WT, razão HFD.

Fonte: Adaptado pelo autor, dados Kegg, renderizado pelo Pathview.



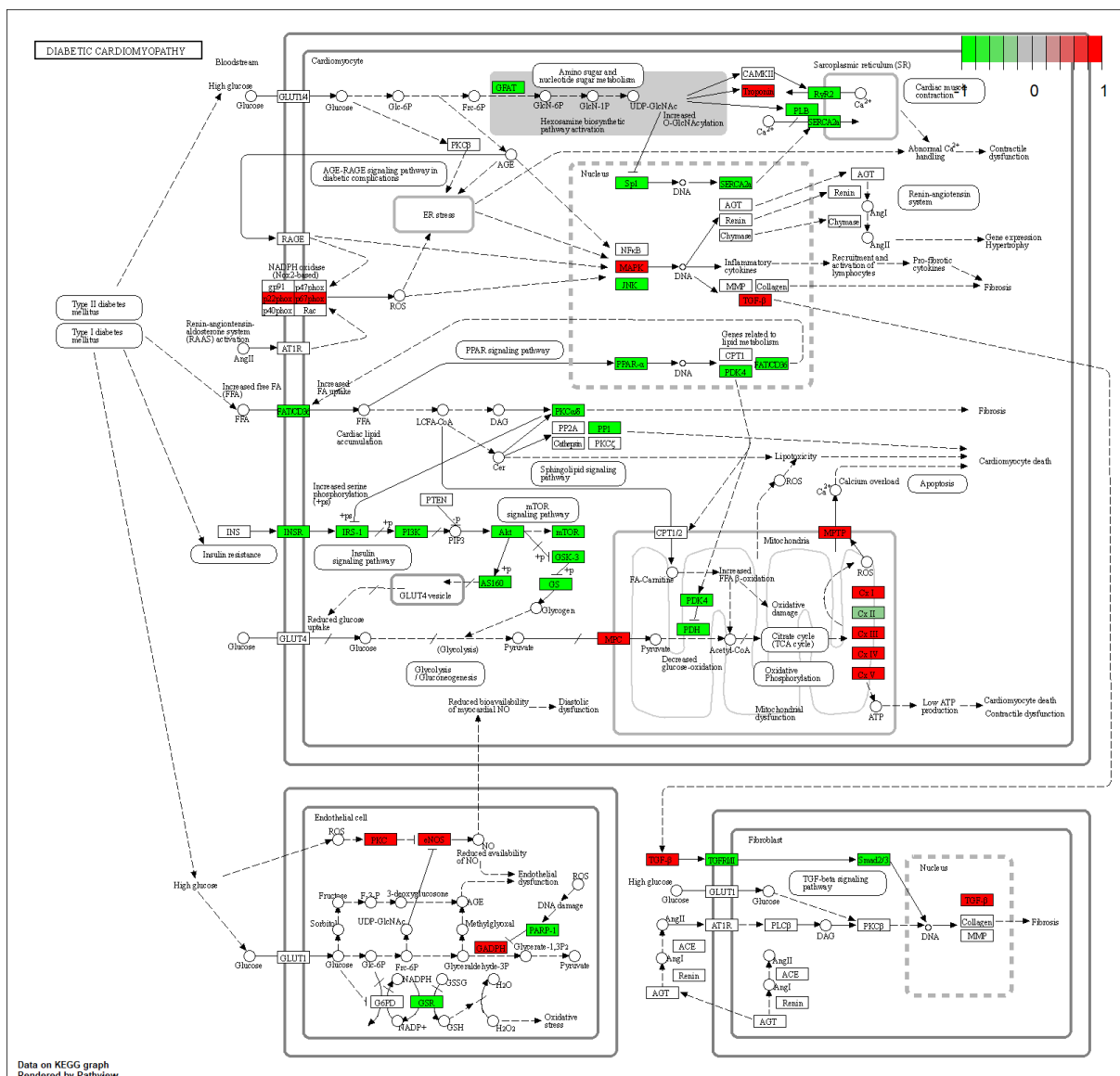


Figura 7 - Mapa de via: Cardiomiopatia Diabética, F1 KO x F1 WT, ração HFD.

Fonte: Adaptado pelo autor, dados Kegg, renderizado pelo Pathview.

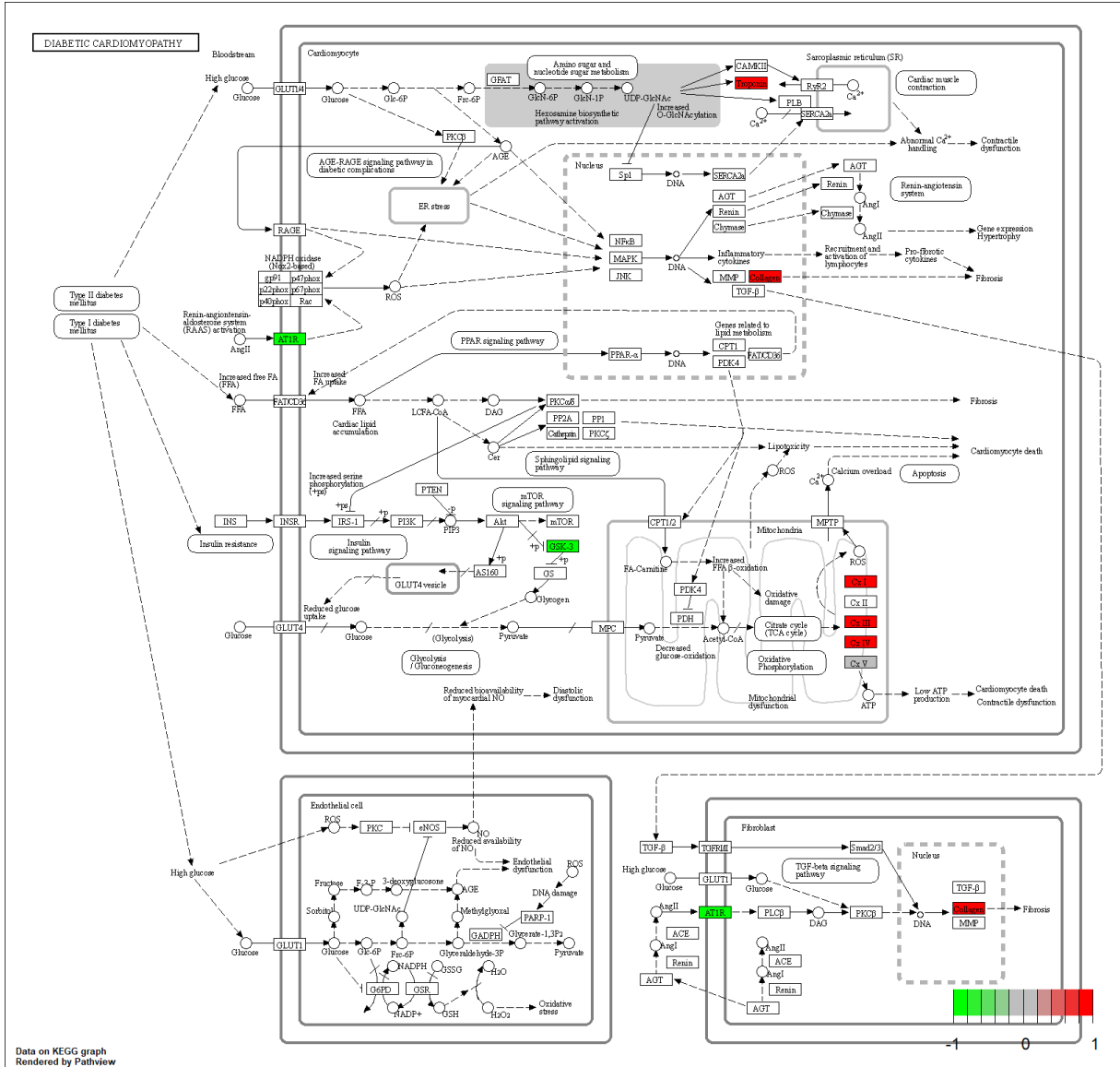


Figura 8 - Mapa de via: Cardiomiopatia Diabética, F1 KO x F1 WT, razão NFD.

Fonte: Adaptado pelo autor, dados Kegg, renderizado pelo Pathview.

Em concordância com os resultados para a via da fosforilação cardíaca, os genes diferencialmente expressos entre as progênes de mães que se alimentavam da ração NFD para a via enriquecida da cardiomiopatia diabética foram menores (Figura 8). Dentre os genes que estão diferencialmente expressos, temos a troponina, o receptor de angiotensina 2 do tipo 1 e colágeno, assim como de subunidades que participam dos complexos da CTE.

## 5.2. ÁREA, PERÍMETRO E AR DAS MITOCÔNDRIAS

Com a obtenção das imagens coletadas pelo microscópio eletrônico de transmissão, foram determinadas a área, perímetro e a razão entre os eixos, como exposto anteriormente, das mitocôndrias de ambos os grupos, como pode ser visto na Figura 9 e 10.

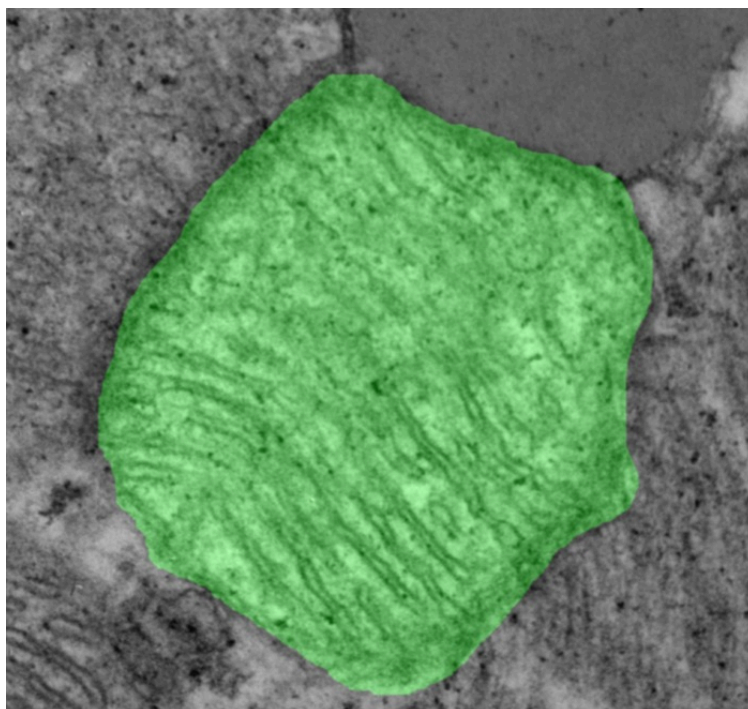


Figura 9 - Imagem capturada pelo microscópio de uma mitocôndria do grupo F1 KO, dieta HFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

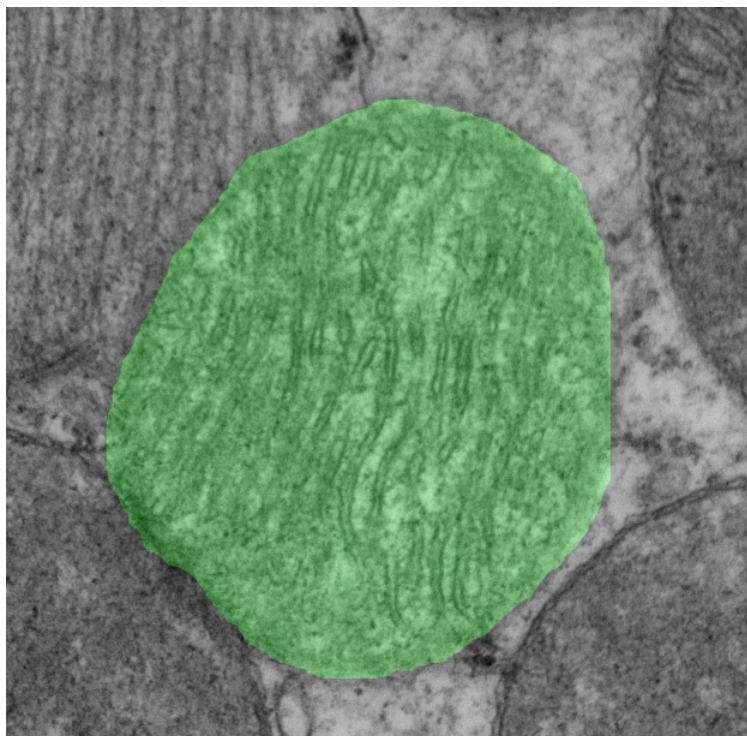


Figura 10 - Imagem capturada pelo microscópio de uma mitocôndria do grupo F1 WT, dieta HFD.

Fonte: elaborado pelo autor.

Após a mensuração individual da mitocôndria de cada grupo, foram estabelecidas as médias de cada parâmetro, indicando uma tênue mudança entre o grupo descendente de mães alimentadas com ração HFD e depletadas da proteína MFN2 em relação aos filhos de fêmeas selvagens alimentadas com ração HFD, exposto na tabela 1.

Grupo	Área $\pm$ DP ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro $\pm$ DP ( $\mu\text{m}$ )	AR $\pm$ DP
KO - HFD	1,076 $\pm$ 0,694	3,763 $\pm$ 1,267	1,432 $\pm$ 0,505
WT - HFD	0,998 $\pm$ 0,600	3,642 $\pm$ 1,193	1,426 $\pm$ 0,400

Tabela 1 - Tabela indicando os valores da média da área, perímetro e AR para cada grupo, com os respectivos desvios-padrões.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, inicialmente, observa-se uma ligeira diferença entre os grupos (Gráficos 7, 8 e 9). Então, foi determinado e testado se as observações seguiam o preceito da normalidade. Para isso, realizou-se uma curva de distribuição dos dados por densidade como aspecto visual (Gráficos 10, 11 e 12), da mesma forma que foi

utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov corrigido por Lilliefors (teste KS) para testar a normalidade dos dados.

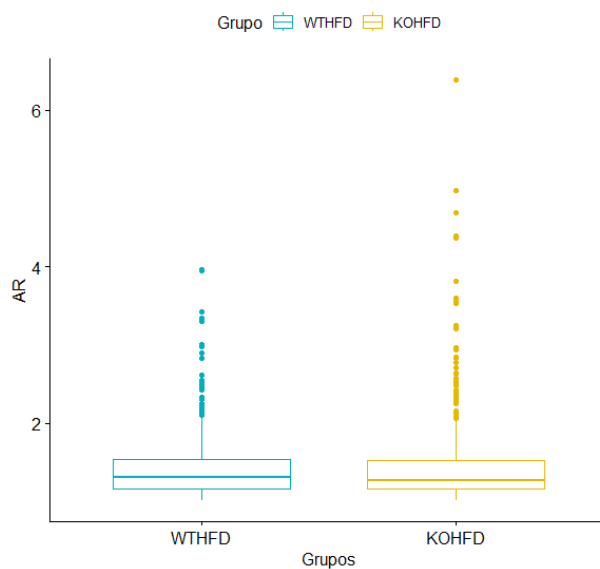


Gráfico 7 - Boxplot da razão entre o diâmetro maior e o menor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

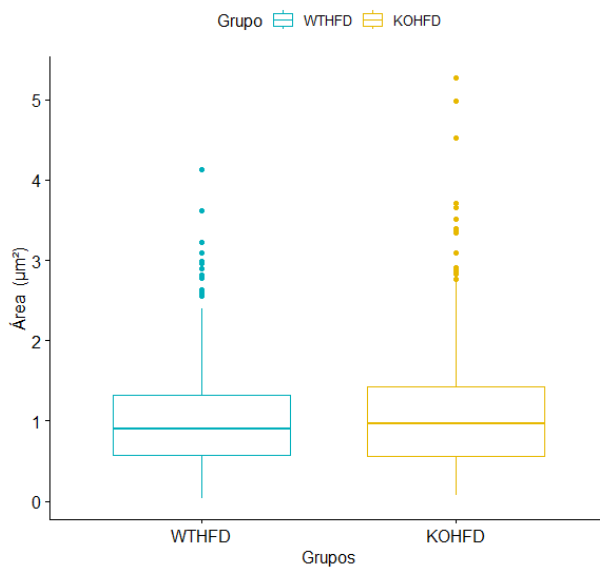


Gráfico 8 - Boxplot da área.

Fonte: Elaborado pelo autor.

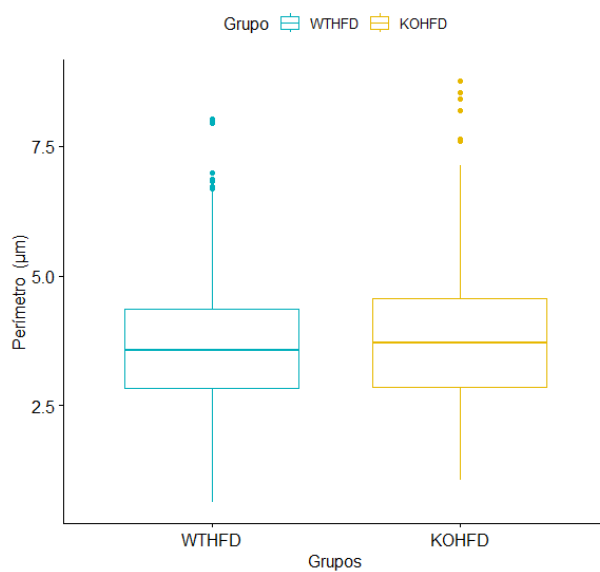


Gráfico 9 - Boxplot do perímetro

Fonte: Elaborado pelo autor.

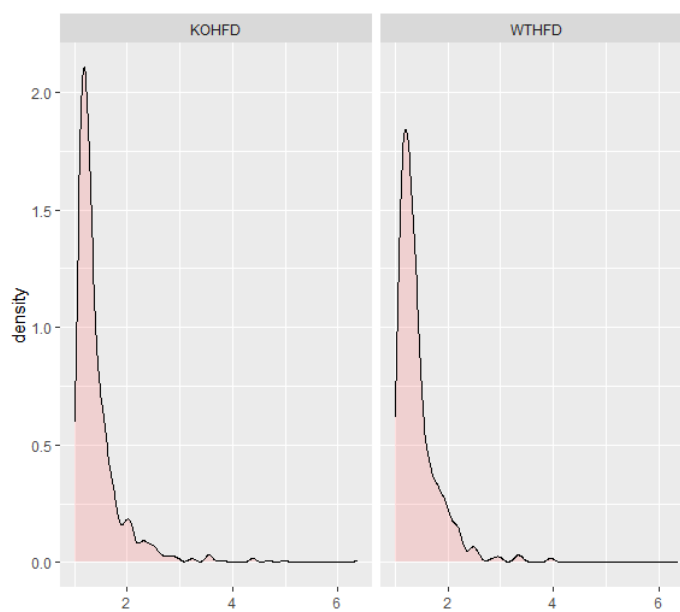


Gráfico 10 - Gráfico de densidade da AR.

Fonte: Elaborado pelo autor.

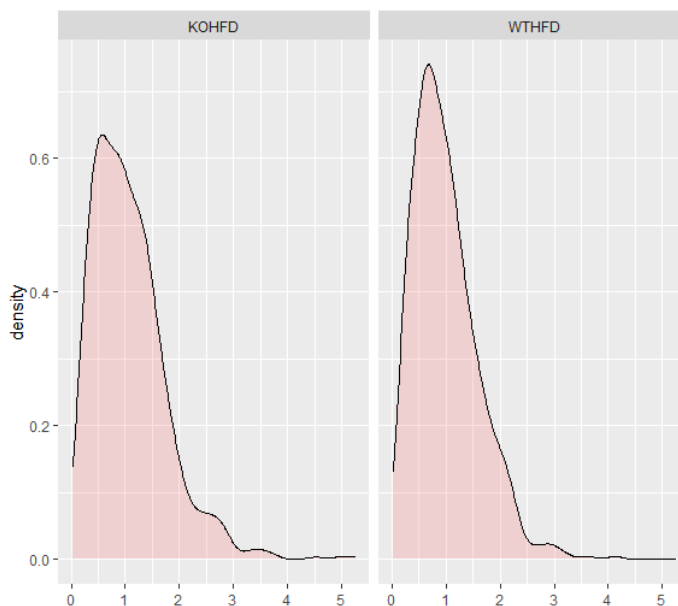


Gráfico 11 - Gráfico de densidade de área.

Fonte: Elaborado pelo autor.

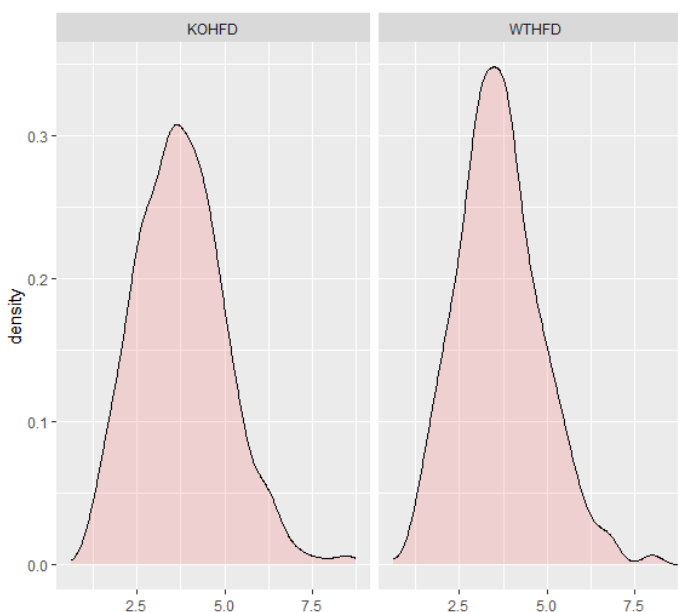


Gráfico 12 - Gráfico de densidade do perímetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em vista disso, nota-se a discrepância quanto à normalidade dos dados. Ademais, o teste de normalidade nos leva a rejeitar a hipótese de que os dados estão normalmente distribuídos; com exceção do perímetro para o grupo KO/HFD, que tanto visualmente quanto pelo teste KS não se rejeita a hipótese da normalidade (valor-P = 0,084). Contudo, quando se observa para o “Q-Q plot”, é possível identificar muitos

quantis amostrais excedendo o intervalo estabelecido no Gráfico 13. Dessa maneira, utilizou-se do teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Assim, a hipótese inicial de uma indiferença entre os grupos para os três parâmetros estabelecidos não foi rejeitada, com nenhuma disparidade aparente na distribuição entre os grupos amostrais (valor-Párea = 0,105; valor-Pperímetro = 0,088; valor-PAR = 0,205).

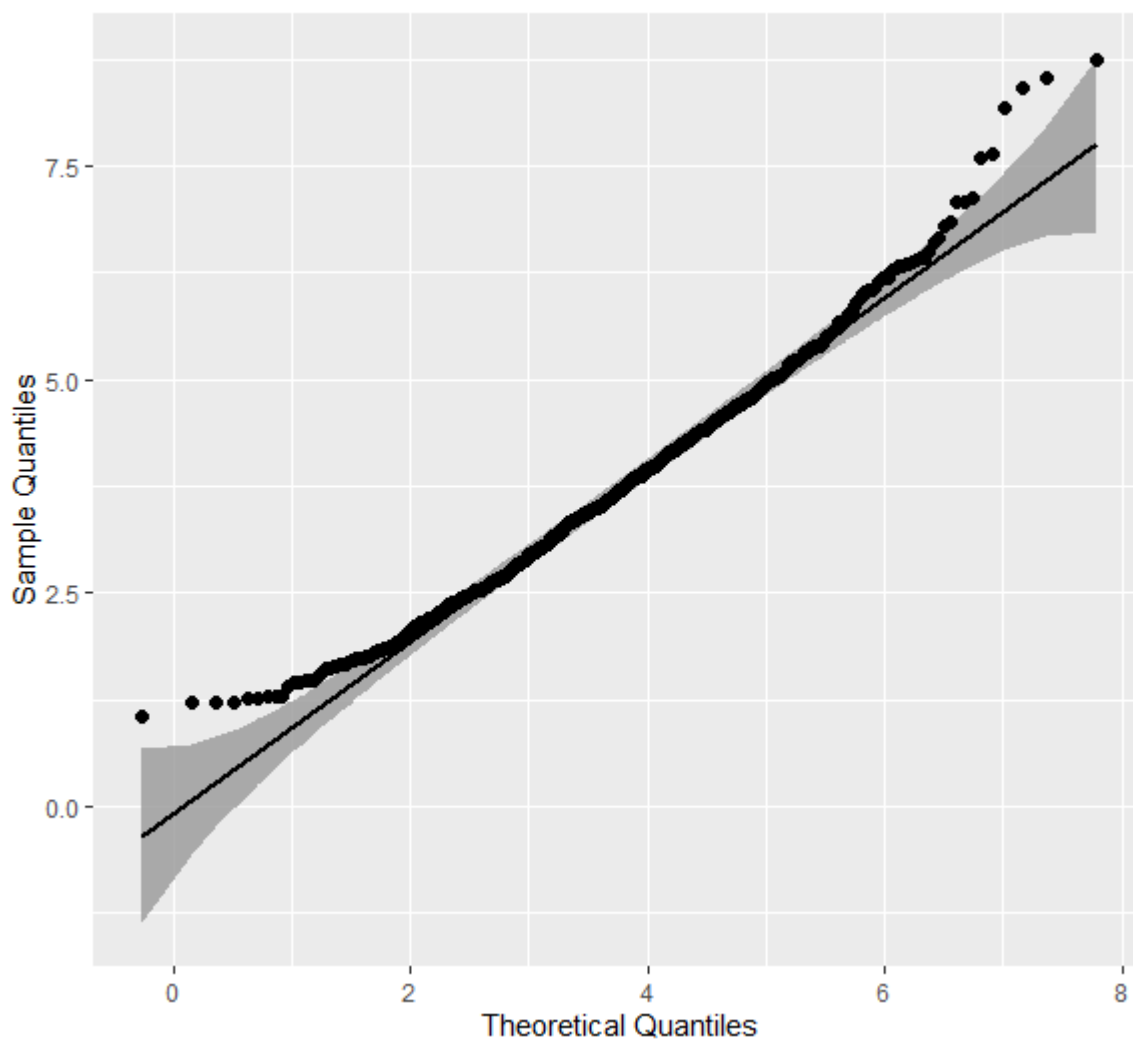


Gráfico 13 - Normal Q-Q plot para o perímetro do grupo KO/HFD.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6. DISCUSSÃO

Diante das informações expostas, os resultados evidenciaram um grande conjunto de genes que estavam diferencialmente expressos entre a progênie F1 KO MFN2 e F1 WT. Além disso, houve um impacto maior na regulação de transcritos quando se foi oferecido uma dieta HFD para as fêmeas que geraram os grupos experimentais, com um número maior de genes positivamente e negativamente expressos do grupo F1 KO MFN2 em relação ao grupo F1 WT. Ainda, estatisticamente, as vias enriquecidas foram muito mais significativas para o grupo em que a mãe apresentava uma dieta HFD, com uma elevada quantidade de genes participando dessas vias a nível transcricional, ainda que morfologicamente não tenha sido observado nenhuma diferença relevante nas análises quantitativas das imagens de microscopia.

Uma das principais questões está na obtenção dos animais para experimento desse trabalho, já que ela está entrelaçada ao fato de que a progênie acaba consumindo a ração da fêmea até seu desmame, por um período de 3 semanas, com efeito direto do consumo da ração na prole. Além disso, existe um grande efeito da gestação e amamentação das fêmeas nos grupos experimentais em estudo em relação à dieta.

Paralelamente, o mesmo genótipo da F1 para todos os grupos experimentais e a escolha de um genótipo específico para ser considerado a fêmea selvagem está relacionado com a abordagem para solucionar o impacto da dose dupla no alelo selvagem, o que poderia trazer problemas em relação a definição do controle no genótipo. Para tanto, essa metodologia garante uma resolução absoluta em relação a determinação de um controle, tornando as análises entre os grupos F1 “justas”.

Nesse prisma, o alinhamento dos grupos experimentais (Figura 1) foi planejado dentro desse contexto, com uma abordagem para normalizar o impacto da dieta, consistindo em conduzir as análises internamente nos regimes alimentares, ou seja, comparando dentro de cada dieta separadamente a progênie em relação ao genótipo das fêmeas (KO MFN2 ou WT). Isso garante “limpar” o efeito da dieta, com enfoque principalmente no genótipo e, portanto, nos efeitos da transmissão materna, oriundos das influências presentes no oócito e que acabam por se manifestar na progênie.

A dieta HFD, nesse caso, teve um papel principalmente para exacerbar o efeito do nocaute oócito-específico da MFN2. Isso é evidente quando se observa os

resultados apresentados. Começando pelos gráficos de dispersão, chamados de “Volcano Plot” também (Gráficos 1 e 2). Nota-se um conjunto maior de genes em que expressão estava alterada de maneira significativa. Chegando aos milhares, tanto para os genes positivamente expressos quanto genes negativamente expressos para o grupo F1 KO MFN2 em relação ao grupo F1 WT. Ainda, é possível visualizar no plano gráfico da Análise de Componente Principal um agrupamento mais distinto entre os indivíduos F1 KO MFN2 e F1 WT para a dieta HFD (Gráficos 3 e 4). Esses resultados ainda foram importantes para as análises de microscopia, que acabaram sendo feitas apenas para os grupos F1 KO MFN2 e F1 WT ligados à dieta HFD da mãe (Tabela 1).

Quando visualizamos as vias que estavam enriquecidas, em especial a da fosforilação oxidativa, nota-se a expressão alterada de genes que participam da síntese de subunidades que participam da CTE entre a F1 KO MFN2 e F1 WT. Como essas subunidades integram e regulam as reações que transportam elétrons entre os complexos (I-IV) e a atividade do complexo V (ATP sintase) (GUO et al., 2018), pode ser que exista perturbações desse processo. Assim, é possível que essas alterações transcricionais estejam atreladas como, por exemplo, o desacoplamento da fosforilação oxidativa, baixo potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e consecutivo estresse mitocondrial (BERRY et al., 2018). O que reforça essa ideia está no nível transcricional do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), regulado positivamente no grupo F1 KO MFN2 (Figura 3).

Esse poro de transição de membrana mitocondrial é um grande canal não específico que se abre na MMI e é conhecido por se formar sob condições de estresse mitocondrial, como sobrecarga de íons bivalentes de cálcio mitocondrial, baixo potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo elevado, o que acaba causando na liberação de enormes quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas pró-apoptóticas das mitocôndrias, podendo levar à uma morte celular (JIA; DEMARCO; SOWERS, 2016; SANCAK et al., 2013).

Na via relacionada com a cardiomiopatia diabética, é provável que se tenha ainda respostas inflamatórias, alterações do ciclo de vida celular e sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  perturbadas. Isso se deve aos resultados que evidenciam a expressão diferencial de genes que atuam nessas respostas, como é o caso da troponina, colágeno, o receptor de angiotensina 2 do tipo 1, MAPK, JNK e TGF-  $\beta$  por exemplo (Figuras 7 e 8)

(ECKENSTALER et al., 2021; FILATOV et al., 1999; LI et al., 2012; YUE et al., 2017). Além disso, para o grupo F1 KO MFN2, os genes RyR2 e SERCA2a, importantes para o tráfego e homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula (BENITAH et al., 2021; ZHIHAO et al., 2020), estão negativamente expressos (Figura 7). Nessa perspectiva, essas alterações da regulação transcricional podem estar conectadas com distúrbios da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , que, por sua vez, geralmente estão ligadas a eventos de estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (GORDALIZA-ALAGUERO; CANTÓ; ZORZANO, 2019).

De maneira paralela, os níveis de expressão do receptor de insulina para o grupo experimental F1 KO MFN2 estão alterados (Figura 7), podendo estarem correlacionados com oscilações na sinalização insulínica e possíveis quadros de intolerância à glicose. Isso pode ocorrer já que a recepção da insulina na célula é realizada pelo receptor de insulina, catalisando a fosforilação e recrutamento de inúmeras moléculas, com a transdução do sinal e a formação de uma cascata de sinalização intracelular, com a translocação de vesículas em que a GLUT4 está integrada para a membrana da célula. A GLUT4, uma vez na membrana, regula o transporte da glicose para dentro da célula (SALTIEL; PESSIN, 2002). Diante disso, disrupções na expressão do receptor de insulina podem estar relacionados com menor captação de glicose pelas células presentes no tecido cardíaco da progênie originadas de fêmeas KO MFN2.

A mitofusina 2 é um modulador muito importante para o metabolismo mitocondrial e da célula, com um papel chave na dinâmica das mitocôndrias e na comunicação com outras organelas. Assim, sua deficiência nas células germinativas femininas, os oócitos, vem sendo atrelada a uma profunda mudança transcriptômica, com perturbações na função mitocondrial, impactando também a homeostase mitocondrial. Ainda, as mitocôndrias de oócitos com a deleção da MFN2 apresentavam um baixo potencial de membrana e, conseqüentemente, uma significativa redução dos níveis de ATP e NAD(P)H, além do aumento de níveis de FAD (GARCIA et al., 2020).

Em adição, a mitofusina 2 possui uma função relevante na regulação do desenvolvimento do oócito, modulando o processo de meiose das células germinativas femininas e a função mitocondrial, fundamental para a maturação e processos de divisão do oócito. Desse jeito, a deficiência da MFN2 está ligada com anormalidades nas estruturas mitocondriais e na formação do fuso durante a meiose.

Isso corrobora com a atividade da MFN2 na programação do metabolismo mitocondrial e o seu impacto nas células germinativas femininas (LIU et al., 2016).

Adicionalmente, desequilíbrios metabólicos na célula acabam geralmente sendo associados com alterações epigenéticas, a nível de cromatina e histona principalmente (KOBAYASHI et al., 2012; SUN et al., 2013). Ainda, marcas epigenéticas encontradas no DNA mitocondrial regulam também a expressão do genoma (SIRARD, 2019).

Dessa forma, as principais origens de mecanismos moleculares que levam a alterações no tecido cardíaco da progênie podem ser oriundas do oócito. Assim, como consequência do nocaute da MFN2, ocorre a reprogramação metabólica, a adaptação ambiental e intracelular do oócito, com a possibilidade de estabelecimento de marcas genéticas em genes que estavam diferencialmente expressos nas células germinativas e que acabaram perdurando na geração seguinte. Dessa maneira, essas marcas podem ser majoritariamente modificações do próprio DNA nuclear e alterações à nível de cromatina e das histonas. Portanto, uma das principais hipóteses é de que para se adaptar aos efeitos do nocaute da MFN2, o oócito é submetido a modificações genéticas de todos os tipos, persistindo na próxima geração.

Ademais, essa hipótese é fortalecida pelos resultados, uma vez que a expressão da mitofusina 2 no tecido cardíaco da progênie é semelhante entre os grupos experimentais dentro de cada dieta. Assim, as alterações na expressão entre um genótipo na progênie não se devem a uma mudança no nível de expressão da MFN2 no tecido cardíaco na progênie, e sim de mecanismos moleculares originados do oócito da mãe.

Outro aspecto importante é a própria herança da mitocôndria. Sabe-se que o nocaute da MFN2 resulta em notáveis alterações morfológicas e funcionais no oócito. Então, é possível que a transmissão dessas mitocôndrias com tais alterações não conceda tempo suficiente para a reparação e seleção deletéria do oócito até a descendência. Dessa forma, mesmo que as análises de microscopia não tenham evidenciado diferenças significativas entre os grupos experimentais para os parâmetros mensurados nas mitocôndrias do tecido cardíaco da progênie, as alterações epigenéticas podem se estender à própria mitocôndria, ou seja, há ocorrências de modificações epigenéticas no DNA mitocondrial, e, portanto, podem auxiliar no esclarecimento das alterações de expressão encontradas nos genes nas

células do tecido cardíaco e até dos genes transcritos atrelados com as mitocôndrias dessas células da progênie.

## 7. CONCLUSÃO

Esse trabalho teve como objetivo determinar mudanças transcricionais e morfológicas das mitocôndrias do tecido cardíaco coletado da progênie de fêmeas obesas que apresentavam nocaute oócito-específico. De acordo com a hipótese inicial, a eliminação de *Mfn2* durante o crescimento do oócito implica à adaptação e resposta do oócito em relação ao nocaute da mitofusina 2, com a transmissão de um perfil transcricional alterado para o tecido cardíaco da progênie. Evidências acerca das mudanças de expressão no tecido cardíaco foram levantadas e essas incluem um profundo impacto transcriptômico desse tecido da progênie de fêmeas que apresentavam deleção da mitofusina 2 no oócito. Ainda, esses efeitos na expressão diferencial da progênie de fêmeas KO MFN2 foram intensificados quando se foi oferecido uma dieta HFD, com milhares de genes diferencialmente expressos entre as progênies oriundas dessas fêmeas em relação às fêmeas WT que consumiam dieta HFD.

Já para a expressão da MFN2, as análises de expressão diferencial não evidenciaram discrepâncias significantes dos níveis de transcritos no tecido cardíaco de indivíduos entre os grupos experimentais estudados, sejam relacionados à dieta HFD ou NFD. Assim, uma vez que se realiza o nocaute da mitofusina 2 no oócito das fêmeas, com subsequente perda da MFN2, há a transmissão materna para a progênie de transformações no transcriptoma do tecido cardíaco, o que incluem a expressão alterada de genes que participam da cadeia transportadora de elétrons e outros componentes mitocondriais, respostas inflamatórias, homeostase de  $Ca^{2+}$  e sinalização mediada por insulina nas células no tecido cardíaco. Quanto às características morfológicas mitocondriais, foram ausentes as diferenças de variáveis quantitativas ligadas a morfologia das mitocôndrias entre os grupos experimentais, em específico entre os grupos F1 KO MFN2 HFD e F1 WT HFD.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho fortalecem a hipótese de um papel da deficiência da mitofusina 2 no oócito na propagação de características transcricionais distintas para o progênie. Como perspectivas futuras, cabe avaliar as características transcricionais e morfológicas do oócito que apresentam deficiência para MFN2, e compará-las com os aspectos manifestados no tecido cardíaco da progênie, a fim de fortificar a hipótese e discussões estabelecidas no presente trabalho. Além do uso da dieta HFD para futuros estudos de impactos transgeracionais

da deficiência da mitofusina 2, já que alterações nas características da progênie tornam-se mais evidentes com seu uso.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. **Artmed Editora**, 2017.
- ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, abr. 1981.
- ANKEL-SIMONS, F.; CUMMINS, J. M. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13859–13863, 26 nov. 1996.
- ARHIN, S. K. et al. Energy Requirements in Mammalian Oogenesis. jul. 2018.
- BACH, D. et al. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism: A NOVEL REGULATORY MECHANISM ALTERED IN OBESITY \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17190–17197, 9 maio 2003.
- BACH, D. et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle: Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-6. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2685–2693, 1 set. 2005.
- BARNETT, R. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 394, n. 10198, p. 557, 17 ago. 2019.
- BELL, M. B. et al. Adult skeletal muscle deletion of Mitofusin 1 and 2 impedes exercise performance and training capacity. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 126, n. 2, p. 341–353, 1 fev. 2019.
- BENADOR, I. Y. et al. Mitochondria Bound to Lipid Droplets: Where Mitochondrial Dynamics Regulate Lipid Storage and Utilization. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 827–835, abr. 2019.
- BENITAH, J. et al. RyR2 and calcium release in heart failure. **Frontiers in physiology**, p. 1597, 2021.
- BERRY, B. J. et al. Use the protonmotive force: mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 21, p. 3873-3891, 2018.
- BHANGOO, M. K. et al. Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3414–3428, set. 2007.
- BIRKY, C. W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11331–11338, 5 dez. 1995.
- BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, maio 2019.

BOUTANT, M. et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 11, p. 1543–1558, jun. 2017.

BROOKS, C. et al. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 28, p. 11649–11654, 10 jul. 2007.

CAO, Y. L. et al. MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. **Nature**, v. 542, n. 7641, p. 372–376, fev. 2017.

CARLSON, S. A. et al. Inadequate Physical Activity and Health Care Expenditures in the United States. **Progress in Cardiovascular Diseases**, 2013 Global Congress on Physical Activity - All Hearts Need Exercise: A Global Call to Action by the AHA. v. 57, n. 4, p. 315–323, 1 jan. 2015.

CHAKRABARTI, R. et al. INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 1, p. 251–268, 15 nov. 2017.

CHEN, H. et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 280-289, 2010.

CHEN, H. et al. Titration of mitochondrial fusion rescues *Mff*-deficient cardiomyopathy. **Journal of Cell Biology**, v. 211, n. 4, p. 795–805, 23 nov. 2015.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells. **Cell metabolism**, v. 26, n. 1, p. 39–48, 5 jul. 2017.

CHEN, H.; CHOMYN, A.; CHAN, D. C. Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26185–26192, 15 jul. 2005.

CHIARATTI, M. R. et al. The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. **Cell Biology International**, v. 42, n. 6, p. 711–724, 2018.

CHIARATTI, M. R. Uncovering the important role of mitochondrial dynamics in oogenesis: impact on fertility and metabolic disorder transmission. **Biophysical Reviews**, v. 13, p. 967-981, 2021.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western diet and the immune system: an inflammatory connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794-811, 2019.

CIPOLAT, S. et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 15927–15932, 9 nov. 2004.

CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **WIREs Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. e294, 2018.

CORNIER, M.-A. et al. Prevention of Overweight/Obesity as a Strategy to Optimize Cardiovascular Health. **Circulation**, v. 124, n. 7, p. 840–850, 16 ago. 2011.

COSSON, P. et al. Mitofusin-2 Independent Juxtaposition of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: An Ultrastructural Study. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46293, 28 set. 2012.

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

DASTE, F. et al. The heptad repeat domain 1 of Mitofusin has membrane destabilization function in mitochondrial fusion. **EMBO reports**, v. 19, n. 6, p. e43637, jun. 2018.

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

DE VRIES, W. N. et al. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. **Genesis**, v. 26, n. 2, p. 110-112, 2000.

DEMONGEOT, J. et al. An open issue: The inner mitochondrial membrane (IMM) as a free boundary problem. **Biochimie**, Transport and redox reactions from mitochondria to NADPH oxidase. v. 89, n. 9, p. 1049–1057, 1 set. 2007.

DEVAUX, F. et al. Posttranscriptional control of mitochondrial biogenesis: Spatio-temporal regulation of the protein import process. **FEBS Letters**, v. 584, n. 20, p. 4273–4279, 2010.

DING, Y. et al. Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) C3275T, tRNA<sup>Gln</sup> T4363C and tRNA<sup>Lys</sup> A8343G mutations may be associated with PCOS and metabolic syndrome. **Gene**, v. 642, p. 299–306, 5 fev. 2018.

DORN, G. W. Mitofusins as mitochondrial anchors and tethers. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 142, p. 146–153, 1 maio 2020.

ELAGIZI, A. et al. A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease. **Current Obesity Reports**, v. 9, n. 4, p. 571–581, dez. 2020.

EMERY, J. M.; ORTIZ, R. M. Mitofusin 2: A link between mitochondrial function and substrate metabolism? **Mitochondrion**, v. 61, p. 125–137, nov. 2021.

ESTIVALETI, J. M. et al. Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 12699, 26 jul. 2022.

ECKENSTALER, R. et al. Angiotensin II receptor type 1—An update on structure, expression and pathology. **Biochemical Pharmacology**, v. 192, p. 114673, 2021.

EURA, Y. et al. Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. **The Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 3, p. 333–344, 1 set. 2003.

FEREY, J. L. A. et al. A maternal high-fat, high-sucrose diet induces transgenerational cardiac mitochondrial dysfunction independently of maternal mitochondrial inheritance. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 316, n. 5, p. H1202–H1210, maio 2019.

FILADI, R. et al. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 17, p. E2174–E2181, 28 abr. 2015.

FILADI, R.; PENDIN, D.; PIZZO, P. Mitofusin 2: from functions to disease. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 28 fev. 2018.

FILATOV, V. L. et al. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. **Biochemistry c/c of Biokhimiia**, v. 64, p. 969-985, 1999.

FLOROS, V. I. et al. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 144–151, fev. 2018.

FRIEDMAN, J. R. et al. ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 3, p. 363–375, 9 ago. 2010.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335–343, jan. 2014.

FULLSTON, T. et al. Female offspring sired by diet induced obese male mice display impaired blastocyst development with molecular alterations to their ovaries, oocytes and cumulus cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 5, p. 725–735, 1 maio 2015.

GARCIA, B. M. et al. Mice born to females with oocyte-specific deletion of mitofusin 2 have increased weight gain and impaired glucose homeostasis. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 12, p. 938-952, 2020.

GEGG, M. E. et al. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 24, p. 4861–4870, 15 dez. 2010.

GIACOMELLO, M. et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, abr. 2020.

GILES, R. E. et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 11, p. 6715–6719, nov. 1980.

GORDALIZA-ALAGUERO, I.; CANTÓ, C.; ZORZANO, A. Metabolic implications of organelle–mitochondria communication. **EMBO reports**, v. 20, n. 9, p. e47928, set. 2019.

GÖBEL, J. et al. Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contacts in Reactive Astrocytes Promote Vascular Remodeling. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 4, p. 791- 808.e8, 7 abr. 2020.

GUO, R. et al. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. **Biomedical journal**, v. 41, n. 1, p. 9-20, 2018.

HALES, K. G.; FULLER, M. T. Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 121–129, 11 jul. 1997.

HASHIMOTO, S. et al. Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 5, p. 573–580, 1 maio 2017.

HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I. et al. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. **Cell**, v. 177, n. 4, p. 881- 895.e17, 2 maio 2019.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254–266, 19 jan. 2017.

HOPPINS, S. et al. The Soluble Form of Bax Regulates Mitochondrial Fusion via MFN2 Homotypic Complexes. **Molecular Cell**, v. 41, n. 2, p. 150–160, 21 jan. 2011.

HOU, Y. J. et al. Both diet and gene mutation induced obesity affect oocyte quality in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 18858, 6 jan. 2016.

ISHIHARA, N.; EURA, Y.; MIHARA, K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 26, p. 6535–6546, 15 dez. 2004.

ISHIKAWA, K. et al. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 661–664, 2 maio 2008.

JA, M. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. S103–S109, 2004.

JAMES, D. I. et al. hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36373–36379, 19 set. 2003.

JANER, A. et al. *SLC 25A46* is required for mitochondrial lipid homeostasis and cristae maintenance and is responsible for Leigh syndrome. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1019–1038, set. 2016.

JANSEN, R. P. S.; DE BOER, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 81–88, 25 out. 1998.

JIA, G.; DEMARCO, V. G.; SOWERS, J. R. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 144–153, 2016.

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

JUNGHEIM, E. S. et al. Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 4039–4046, 1 ago. 2010.

KALIA, R. et al. Structural basis of mitochondrial receptor binding and constriction by DRP1. **Nature**, v. 558, n. 7710, p. 401–405, jun. 2018.

KARBOWSKI, M. et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 6, p. 931–938, 23 dez. 2002.

KAUFMAN, B. A.; LI, C.; SOLEIMANPOUR, S. A. Mitochondrial regulation of  $\beta$ -cell function: Maintaining the momentum for insulin release. **Molecular Aspects of Medicine**, Pancreatic beta cell failure and Diabetes. v. 42, p. 91–104, 1 abr. 2015.

KLECKER, T.; BÖCKLER, S.; WESTERMANN, B. Making connections: interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 9, p. 537–545, 1 set. 2014.

KOBAYASHI, H. et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. **PLoS genetics**, v. 8, n. 1, p. e1002440, 2012.

KOROBOVA, F.; RAMABHADHRAN, V.; HIGGS, H. N. An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. **Science**, v. 339, n. 6118, p. 464–467, 25 jan. 2013.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondrial morphology regulates organellar  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and changes cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13176–13188, dez. 2019.

LABBÉ, K.; MURLEY, A.; NUNNARI, J. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 357–391, 2014.

LAVIE, C. J. et al. Obesity and Cardiovascular Diseases: Implications Regarding Fitness, Fatness, and Severity in the Obesity Paradox. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 14, p. 1345–1354, 15 abr. 2014.

LAVIE, C. J. et al. Management of cardiovascular diseases in patients with obesity. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 1, p. 45–56, jan. 2018.

LAVIE, C. J.; ARENA, R.; BLAIR, S. N. A call to increase physical activity across the globe in the 21st century. **Future Cardiology**, v. 12, n. 6, p. 605–607, nov. 2016.

LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **REPRODUCTION**, v. 143, n. 4, p. 417–427, abr. 2012.

LEITCH, H. G.; TANG, W. W. C.; SURANI, M. A. Chapter Five - Primordial Germ-Cell Development and Epigenetic Reprogramming in Mammals. Em: HEARD, E. (Ed.). **Current Topics in Developmental Biology**. Epigenetics and Development. [s.l.] Academic Press, 2013. v. 104p. 149–187.

LI, C. et al. Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. **Cardiovascular diabetology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2012.

LI, Y. J. et al. Structural insights of human mitofusin-2 into mitochondrial fusion and CMT2A onset. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4914, 29 out. 2019.

LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 491–506, abr. 2013.

LIU, Q. et al. Mitofusin 2 regulates the oocytes development and quality by modulating meiosis and mitochondrial function. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 30561, 2016.

LOSÓN, O. C. et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 5, p. 659–667, mar. 2013.

LÓPEZ-TABOADA, I.; GONZÁLEZ-PARDO, H.; CONEJO, N. M. Western diet: implications for brain function and behavior. **Frontiers in psychology**, v. 11, p. 564413, 2020.

LOW, H. H. et al. Structure of a Bacterial Dynamin-like Protein Lipid Tube Provides a Mechanism For Assembly and Membrane Curving. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1342–1352, 24 dez. 2009.

LUZZO, K. M. et al. High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49217, 12 nov. 2012.

MANOR, U. et al. A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. **eLife**, v. 4, p. e08828, 25 ago. 2015.

MARCUS, B. H. et al. Physical Activity Intervention Studies. **Circulation**, v. 114, n. 24, p. 2739–2752, 12 dez. 2006.

MATTIE, S. et al. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 2, p. 507–515, 6 dez. 2017.

MATTIE, S.; KROLS, M.; MCBRIDE, H. M. The enigma of an interconnected mitochondrial reticulum: new insights into mitochondrial fusion. **Current Opinion in Cell Biology**, Membrane Trafficking. v. 59, p. 159–166, 1 ago. 2019.

MAY-PANLOUP, P. et al. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 65, 14 nov. 2005.

MOTTA, P. M. et al. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. **Human Reproduction**, v. 15, n. suppl\_2, p. 129–147, 1 jul. 2000.

MOURIER, A. et al. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. **Journal of Cell Biology**, v. 208, n. 4, p. 429–442, 16 fev. 2015.

MU, M. et al. Dietary Patterns and Overweight/Obesity: A Review Article. **Iran J Public Health**, v. 46, 2017.

NAAMATI, A. et al. Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, lcp55. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 44, p. 30200–30208, 30 out. 2009.

NAON, D. et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 40, p. 11249–11254, 4 out. 2016.

NEUPERT, W. A Perspective on Transport of Proteins into Mitochondria: A Myriad of Open Questions. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 6, p. 1135–1158, mar. 2015.

OKTAY, A. A. et al. The Interaction of Cardiorespiratory Fitness With Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Physical Activity, Exercise and Fitness in Health and Disease. v. 60, n. 1, p. 30–44, 1 jul. 2017.

OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2944–2954, 1 dez. 2010.

OTERA, H. et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 6, p. 1141–1158, 13 dez. 2010.

PALMER, C. S. et al. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. **EMBO reports**, v. 12, n. 6, p. 565–573, jun. 2011.

PARTO, P.; LAVIE, C. J. Obesity and Cardiovascular Diseases. **Current Problems in Cardiology**, v. 42, n. 11, p. 376–394, 1 nov. 2017.

PASQUARIELLO, R. et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans†. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 4, p. 971–981, 1 abr. 2019.

PICH, S. et al. The Charcot–Marie–Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 11, p. 1405–1415, 1 jun. 2005.

POOLE, A. C. et al. The Mitochondrial Fusion-Promoting Factor Mitofusin Is a Substrate of the PINK1/Parkin Pathway. **PLOS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10054, 7 abr. 2010.

POULTON, J. et al. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. **Diabetologia**, v. 41, n. 1, p. 54–58, 1 jan. 1998.

QI, Y. et al. Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering. **Journal of Cell Biology**, v. 215, n. 5, p. 621–629, 5 dez. 2016.

RAMÍREZ, S. et al. Mitochondrial Dynamics Mediated by Mitofusin 1 Is Required for POMC Neuron Glucose-Sensing and Insulin Release Control. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 1390 - 1399.e6, 6 jun. 2017.

RATTANATRAY, L. et al. Impact of Maternal Periconceptional Overnutrition on Fat Mass and Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Visceral and Subcutaneous Fat Depots in the Postnatal Lamb. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5195–5205, 1 nov. 2010.

RIZZUTO, R. et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5370, p. 1763–1766, 12 jun. 1998.

ROJO, M. et al. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 8, p. 1663–1674, 15 abr. 2002.

RUAGER-MARTIN, R.; HYDE, M. J.; MODI, N. Maternal obesity and infant outcomes. **Early Human Development**, Selected Proceedings of the Neonatal Update 2010. v. 86, n. 11, p. 715–722, 1 nov. 2010.

RUEBEL, M. L. et al. Obesity Modulates Inflammation and Lipid Metabolism Oocyte Gene Expression: A Single-Cell Transcriptome Perspective. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 6, p. 2029–2038, 1 jun. 2017.

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

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 2, p. 65-71, 2002.

SANCAK, Y. et al. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. **Science**, v. 342, n. 6164, p. 1379-1382, 2013.

SANTEL, A. et al. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 13, p. 2763–2774, 1 jul. 2003.

SARPARANTA, J.; GARCIA-MACIA, M.; SINGH, R. Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 13, n. 4, p. 352–369, 1 ago. 2017.

SCHNEEBERGER, M. et al. Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 10.1016/j.cell.2013.09.003, 26 set. 2013.

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

SCORRANO, L. et al. A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. **Developmental Cell**, v. 2, n. 1, p. 55–67, jan. 2002.

SEBASTIÁN, D. et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5523–5528, 3 abr. 2012.

SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 2, p. R528–R538, fev. 2008.

SILVA, J. P. et al. Impaired insulin secretion and  $\beta$ -cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 336–340, nov. 2000.

SILVESTRIS, E.; LOVERO, D.; PALMIROTTA, R. Nutrition and female fertility: an interdependent correlation. **Frontiers in endocrinology**, p. 346, 2019.

SIRARD, M. -A. Distribution and dynamics of mitochondrial DNA methylation in oocytes, embryos and granulosa cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11937, 2019.

SMIRNOVA, E. et al. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 8, p. 2245–2256, ago. 2001.

ST. JOHN, J. C. Mitochondria and Female Germline Stem Cells—A Mitochondrial DNA Perspective. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 852, ago. 2019.

ST. JOHN, J. C. et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 5, p. 488–509, 1 set. 2010.

STOJANOVSKI, D. et al. Mechanisms of Protein Sorting in Mitochondria. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 10, p. a011320–a011320, 1 out. 2012.

SUN, Z. et al. High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 567–576, 2013.

SZABADKAI, G. et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 6, p. 901–911, 18 dez. 2006.

TAYLOR, A. B. et al. Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. **Structure (London, England: 1993)**, v. 9, n. 7, p. 615–625, 3 jul. 2001.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341–360, 20 jul. 2018.

TOLEDO, F. G. S.; WATKINS, S.; KELLEY, D. E. Changes Induced by Physical Activity and Weight Loss in the Morphology of Intermyo-fibrillar Mitochondria in Obese Men and Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3224–3227, 1 ago. 2006.

TRIMARCHI, J. R. et al. Oxidative Phosphorylation-Dependent and -Independent Oxygen Consumption by Individual Preimplantation Mouse Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1866–1874, 1 jun. 2000.

VALM, A. M. et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. **Nature**, v. 546, n. 7656, p. 162–167, jun. 2017.

VÖGTLE, F.-N. et al. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 428–439, 16 out. 2009.

VÖGTLE, F. N. et al. Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 13, p. 2135–2143, 1 jul. 2011.

WAI, T.; TEOLI, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1484–1488, dez. 2008.

WALLACE, D. C. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1482–1488, 5 mar. 1999.

WALLACE, D. C. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases.

**Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1622, p. 20120267, 19 jul. 2013.

WANG, Q. et al. Maternal Diabetes Causes Mitochondrial Dysfunction and Meiotic Defects in Murine Oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 10, p. 1603–1612, 1 out. 2009.

WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. **Journal of Morphology**, v. 156, n. 2, p. 209–235, 1978.

WEINTRAUB, W. S. et al. Value of Primordial and Primary Prevention for Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 124, n. 8, p. 967–990, 23 ago. 2011.

WU, L. L. et al. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. **Development**, v. 142, n. 4, p. 681–691, 15 fev. 2015.

WU, L. L. Y. et al. High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438–5445, 1 nov. 2010.

YAN, L. et al. Structural basis for GTP hydrolysis and conformational change of MFN1 in mediating membrane fusion. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 233–243, mar. 2018.

YOUNG, J. C.; HOOGENRAAD, N. J.; HARTL, F. U. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. **Cell**, v. 112, n. 1, p. 41–50, 10 jan. 2003.

YUE, Y. et al. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes research and clinical practice**, v. 133, p. 124–130, 2017.

ZACHARIOUDAKIS, E. et al. Modulating mitofusins to control mitochondrial function and signaling. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3775, 7 jul. 2022.

ZARA, V. et al. Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90. **The Biochemical journal**, v. 419, n. 2, p. 369–375, 15 abr. 2009.

ZHIHAO, L. et al. SERCA2a: a key protein in the Ca<sup>2+</sup> cycle of the heart failure. **Heart failure reviews**, v. 25, p. 523–535, 2020.

ZHU, T. T. et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling by promoting mitofusin-2-mediated mitochondrial fusion. **European Journal of Pharmacology**, v. 809, p. 42–51, 15 ago. 2017.

ZIVIANI, E.; TAO, R. N.; WHITWORTH, A. J. Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 5018–5023, 16 mar. 2010.

ZORZANO, A. et al. Mitofusin 2 as a Driver That Controls Energy Metabolism and Insulin Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 12, p. 1020–1031, 20 abr. 2015.

ZORZANO, A.; PICH, S. What is the biological significance of the two mitofusin proteins present in the outer mitochondrial membrane of mammalian cells? **IUBMB Life**, v. 58, n. 7, p. 441–443, 2006.