



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

Rachel Andrade Marascalchi

**EFEITO DO NOCAUTE FÍGADO-ESPECÍFICO DA MITOFUSINA 2 SOBRE O
ACÚMULO DE DNA MITOCONDRIAL NZB/BINJ EM CAMUNDONGOS**

São Carlos/SP

2021

Rachel Andrade Marascalchi

**EFEITO DO NOCAUTE FÍGADO-ESPECÍFICO DA MITOFUSINA 2 SOBRE O
ACÚMULO DE DNA MITOCONDRIAL NZB/BINJ EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de bacharel em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos/SP

2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu pai, por todo apoio e acolhimento durante todos esses anos longe de casa. Você me ensinou a ser forte e não há palavras que descrevam a gratidão e orgulho que eu tenho de você. Agradeço também a minha irmã, minha tia e meu primo, por terem me dado amparo ao longo desses anos.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento concedido e ao meu orientador Professor Marcos Roberto Chiaratti pela oportunidade. Também agradeço a Professora Maria Cristina da Silva Pranchevicius, por todo apoio ao longo da graduação e ao Prof. William T. Festuccia, da Universidade de São Paulo, pela doação da linhagem *Alb-Cre*.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Angélica, Carol, Renan, Fabrícia e Lindomar, por sempre me incentivarem e por tornarem o ambiente muito mais amigável e caloroso. Um agradecimento especial aos mais animados do laboratório, Djaci e Mateus, pelo companheirismo e por todos os dias que eu pude passar ao lado de vocês dois. E por fim, agradeço imensamente a Katiane, por todo auxílio e por ter se empenhado tanto ao longo deste projeto.

Agradeço aos meus amigos de turma Matheus, Júnior e Adriele por tantas vezes me acolherem em momentos de desespero. E um agradecimento especial aos meus melhores amigos, Karina, Vinícius, Daniel e Stephany, por me apoiarem nos piores momentos, por acreditarem em mim quando eu não acreditava, pelo suporte e pela consistência de uma amizade sincera.

Agradeço às minhas amigas de Campinas, Giovanna e Ana, pela nossa amizade de nove anos que vêm sendo cultivada com muito amor, carinho, respeito e dedicação.

Agradeço aos meus veteranos, Marlon, Giovanna, Samuel, Belle e Semira por todo carinho.

Agradeço a Ideli por toda paciência e por me acolher no seu lar e no seu coração.

Agradeço aos meus amigos que conheci em São Carlos, Caio, Rafael, Gabriel, Bárbara, Natália, Fabrício, Artur, Sérgio e Larissa por contribuírem no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço especialmente ao meu amigo Edson, por todos os ensinamentos, por ter me incentivado e por ter me estendido a mão tantas vezes.

Agradeço a todos que participaram comigo nos projetos de extensão, LINA e LAIIM, que foram tão importantes para que eu encontrasse propósito na ciência.

E por fim, agradeço a minha psicóloga Amanda, por me auxiliar no processo de autoconhecimento e por todo apoio nesse período de isolamento social.

RESUMO

O DNA mitocondrial (mtDNA) de mamíferos está sujeito a elevada frequência de mutações que podem desencadear doenças graves. Para desencadear uma patologia, o nível de mutação deve ultrapassar uma quantidade mínima, que varia entre tecidos. Isso porque, múltiplas cópias de mtDNA estão presentes em cada célula e moléculas mutantes normalmente co-existem com moléculas selvagens (heteroplasmia). O acúmulo de mutações no mtDNA é bastante acentuado no fígado. As mitocôndrias estão sujeitas a eventos contínuos de fusão e fissão, que permite a troca de conteúdo entre diferentes mitocôndrias de uma mesma célula. No entanto, em casos em que há mutações no mtDNA, os eventos de dinâmica espalham a mutação pela rede mitocondrial, dificultando a sua eliminação. Utilizando camundongos nocaute para a mitofusina 2 (*Mfn2*) e heteroplásmicos, contendo um haplótipo mitocondrial selvagem e um mutante, foi visto que os animais apresentaram um acúmulo de aproximadamente 17% nos níveis do haplótipo mutante em relação ao nível inicial presente. Ou seja, o acúmulo de mtDNA mutante continuou acontecendo no tecido hepático, independente da expressão de *Mfn2*. A MFN2 desempenha um papel crítico na fusão mitocondrial e na interação de mitocôndrias com o retículo endoplasmático. Portanto, com este modelo experimental, fornecemos evidências de que o acúmulo de mtDNA no fígado ocorre independentemente da expressão de MFN2.

Palavras-chave: mitocôndria, mtDNA, mutação, heteroplasmia, *Mfn2*, fígado.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Obtenção dos animais dos grupos experimentais.....	10
Figura 2: Deleção condicional do gene <i>Mfn2</i> no fígado.....	15
Figura 3: Coleta de tecidos de animais com 100 dias.....	16
Figura 4. Seleção dos animais para os grupos experimentais (WT e <i>Mfn2</i>^{-/-}).....	17
Figura 5. Análise da expressão gênica por qPCR.....	17
Figura 6: Determinação do nível de mtDNA NZB na cauda.....	18
Figura 7: O nocaute de <i>Mfn2</i> não interfere sobre o acúmulo de mtDNA NZB no fígado.....	18
Figura 8: O nocaute de <i>Mfn2</i> não interfere sobre o número de cópias de mtDNA total no fígado.....	19
Figura 9: O nocaute de <i>Mfn2</i> não interfere sobre a diferença no nível de NZB (ΔNZB) entre o fígado e cauda.....	19
Figura 10: O nocaute de <i>Mfn2</i> não interfere sobre a diferença no nível de NZB (ΔNZB transformado) entre o fígado e cauda.....	20

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para genotipagem dos animais.....	11
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> utilizados para determinar o nível de NZB nos tecidos.....	12
Tabela 3: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para quantificar o número de cópias de mtDNA presente nos tecidos.....	12
Tabela 4: Sequência de <i>primers</i> para determinar a expressão gênica.....	13

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

BL6: camundongo C57BL/6J

ER: retículo endoplasmático

MERCs: sítio de contato do retículo endoplasmático mitocondrial

Mfn2^{-/-}: animal nocaute

mtDNA: DNA mitocondrial

nDNA: DNA nuclear

NZB: camundongo NZB/BINJ

OXPPOS: fosforilação oxidativa

PCR: reação em cadeia da polimerase

Primer F: primer senso

Primer R: primer anti-senso

qPCR: PCR quantitativa

ROS: espécies reativas de oxigênio

WT: animal controle selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Mitocôndria.....	1
1.2. mtDNA e mutações.....	2
1.3. Dinâmica mitocondrial.....	3
1.4. MFN2.....	5
1.5. Modelo experimental	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1. Acasalamento e manutenção dos animais.....	9
3.2. Coleta de tecidos	10
3.3. Genotipagens.....	10
3.4. Análise da heteroplasmia e número de cópias de mtDNA	11
3.5. Expressão gênica.....	12
3.6. Análise de dados	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na geração de energia, mas também controlam uma miríade de funções do organismo (WALLACE, 2018). Quase todos os indivíduos são portadores de baixos níveis de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), que podem ser transmitidas maternamente. Essas mutações podem desencadear doenças mitocondriais e estão associadas a distúrbios, como Parkinson e Alzheimer (PAYNE et al. 2013; STEWART e CHINERRY, 2015). Os níveis de uma mesma mutação no mtDNA costumam variar bastante entre tecidos, podendo se acumular com o envelhecimento principalmente em tecidos que demandam grande aporte energético (CHINERRY e HUDSON, 2013; LI et al., 2015). Curiosamente, isto é bastante acentuado no tecido hepático, com acúmulo de mutações não-sinônimas no mtDNA (JENUTH et al. 1997; LI et al. 2015). As mitocôndrias são altamente dinâmicas para responder a diferentes situações e dispõem de mecanismos de fissão e fusão para adaptação (CHEN, CHAN 2017). A fusão mitocondrial permite a mistura do conteúdo entre duas mitocôndrias, podendo diluir as moléculas mutantes entre as organelas (MISHRA e CHAN, 2014) e pode estar relacionada com o padrão de acúmulo de mutações no mtDNA do fígado.

1.1 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas originadas a partir da associação de uma bactéria primitiva com uma célula procariótica, resultado de uma relação simbiótica entre elas. Após a simbiose, a bactéria primitiva passou a ser uma organela com dupla membrana e com o tempo transferiu seu material genético para a célula hospedeira. Ao passar dos anos, o genoma da organela foi reduzido, consolidando a relação simbiótica e resultando no que hoje conhecemos por mitocôndrias (STEWART e CHINERRY, 2015).

As mitocôndrias são conhecidas por desempenharem um papel fundamental no metabolismo energético, através da produção de trifosfato de adenosina (ATP) decorrente da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Além disso, também atuam na sinalização intracelular de cálcio, na biossíntese de aminoácidos e aglomerados de ferro-enxofre, além de estarem relacionadas com os processos de apoptose, envelhecimento (KÜHLBRANDT, 2015), imunidade inata e autofagia (TILOKANI et al. 2018).

Essas organelas são constituídas por dupla membrana (externa e interna), um espaço entre essas membranas e uma matriz (WALLACE e CHALKIA, 2013). A membrana externa é voltada para o citosol (TILOKANI et al. 2018), sendo composta por poros que permitem a passagem livre de íons e pequenas moléculas sem carga; para proteínas e moléculas maiores, o transporte é mediado por translocases, o que auxilia na importação de centenas de proteínas codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) que são traduzidas no citosol. E por fim, a matriz mitocondrial é o local em que ocorre a maioria das reações enzimáticas e biossintéticas, como o ciclo do ácido tricarboxílico (KÜHLBRANDT, 2015).

A membrana interna sofre invaginações que são conhecidas como as cristas mitocondriais. É na membrana destas cristas que estão localizados os cinco complexos enzimáticos (I, II, III, IV e V) da cadeia transportadora de elétrons (KÜHLBRANDT, 2015). A oxidação de moléculas energéticas como açúcares, lipídios e proteínas, acabam por gerar elétrons que são transportados ao longo dos complexos I, II, III e IV. A transferência de elétrons entre os complexos I e IV, por sua vez, gera energia que é utilizada para o bombeamento de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. O acúmulo de H^+ no espaço intermembranar gera um gradiente eletroquímico na mitocôndria que é utilizado como força motriz pelo complexo V para a produção de ATP. Por fim, o ATP produzido é exportado para o citosol, atuando em diversas reações celulares (WALLACE e CHALKIA, 2013).

1.2. mtDNA e mutações

Devido a sua origem endossimbiótica, a mitocôndria possui um genoma próprio, o mtDNA. Em humanos e camundongos, o mtDNA contém ~16,5 kb, é circular, não apresenta íntrons e está localizado na matriz mitocondrial, preso a membrana interna (WALLACE e CHALKIA, 2013). O mtDNA codifica para 37 RNAs necessários para a síntese de 13 polipeptídeos que compõem parte dos complexos I, III, IV e V da cadeia transportadora de elétrons. Porém, o empacotamento, replicação e transcrição do mtDNA, bem como a edição e modificação dos transcritos codificados pelo mtDNA, são processos que estão sob o controle do núcleo dado que este codifica a maioria das proteínas mitocondriais (STEWART e CHINERRY, 2015). Portanto, o funcionamento mitocondrial depende da expressão coordenada do nDNA e mtDNA (WALLACE, 2018).

Estima-se que a taxa de mutações no mtDNA é aproximadamente 10 vezes maior em comparação ao genoma nuclear (SATO, NAKADA, HAYASHI, 2006). Inicialmente, essa elevada taxa era atribuída ao fato de a mitocôndria constituir a principal fonte de espécies

reativas de oxigênio (ROS), aumentando a susceptibilidade do mtDNA a lesões oxidativas. Porém, resultados mais recentes que isso se deve principalmente a erros replicativos, apesar da mitocôndria dispor de mecanismos de reparo (WALLACE e CHALKIA, 2013). Somado a isso, o mtDNA apresenta uma alta densidade gênica, resultando em elevada frequência (~1:5.000) de doenças causadas por mutações no mtDNA (GORMAN et al. 2015).

Uma vez que uma célula abriga várias cópias de mtDNA, o surgimento de uma mutação não afeta todo o conjunto de moléculas de uma vez. Nesse contexto, moléculas de mtDNA mutadas coexistem com moléculas selvagens - condição denominada heteroplasmia (STEWART e CHINERRY, 2015). Visto que, o mtDNA é fundamental para a codificação e funcionamento da maquinaria bioenergética da célula, pequenas variações neste genoma podem ter impactos graves (JOHNSTON e JONES, 2016). Variantes de mtDNA em humanos já foram relacionadas à motilidade de espermatozoides, longevidade e predisposição a diversos distúrbios complexos (MORENO-LOSHUERTOS et al. 2006). A manifestação de patologias depende da proporção de mtDNA mutado presente em um tecido (JOHNSTON e JONES, 2016). Em níveis baixos as mutações no mtDNA podem ter efeitos fenotípicos desprezíveis. Porém, ao exceder um limiar crítico, pode levar ao desenvolvimento de doenças mitocondriais (PEREIRA; GITSCHLAG; PATEL, 2021).

Já foi demonstrado que a segregação de mtDNA em alguns tecidos não é aleatória, de forma a selecionar progressivamente um haplótipo em detrimento de outros, o que é conhecido como viés de segregação (JENUTH et al. 1997; BURGSTALLER et al. 2014). De acordo com Lechuga-Vieco et al. (2020), a seleção de mutações é um evento intracelular, em que as células podem selecionar positivamente ou negativamente, de acordo com sua demanda energética requerida pela OXPHOS. Desta forma, os requisitos metabólicos de cada tipo celular direcionam a preferência por um haplótipo mitocondrial (LEGHUGA-VIECO et al. 2020).

1.3. Dinâmica mitocondrial

Dependendo do tipo celular, o número de mitocôndrias pode variar, sendo maior em células metabolicamente ativas, como por exemplo, os hepatócitos. As mitocôndrias não se mantêm isoladas, pelo contrário, eventos contínuos de fissão e fusão permitem que essas organelas sejam dinâmicas para se adaptarem a diferentes situações, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes. O termo “dinâmica mitocondrial” abrange este comportamento realizado para misturar o conteúdo de mitocôndrias, controlar sua morfologia e promover maior funcionalidade (CHEN e CHAN, 2017). Além destes processos, a dinâmica mitocondrial

também se associa com a movimentação de mitocôndrias ao longo do citoesqueleto, além de regular o controle de qualidade mitocondrial por meio da autofagia preferencial de mitocôndrias disfuncionais (NI et al. 2015).

A fissão e fusão mitocondrial apesar de serem opostas, devem ser equilibradas de forma que a morfologia das mitocôndrias se mantenha adequada em uma dada célula (CHEN e CHAN, 2017). A extensão da rede mitocondrial depende do equilíbrio entre o alongamento e fragmentação de mitocôndrias (MALENA et al. 2009). Ambos os processos de fissão e fusão ocorrem de forma autônoma (PERNAS e SCORRANO, 2016). A importância da dinâmica mitocondrial é observada, por exemplo, nos casos de perda da capacidade de fissão ou fusão, onde se observa a instabilidade do mtDNA, disfunção mitocondrial e fenótipos patológicos (CHEN e CHAN, 2017).

A fissão mitocondrial é o processo pelo qual uma mitocôndria se divide em duas mitocôndrias filhas (TILOKANI et al. 2018). É principalmente mediado pela GTPase DRP1 (*dynamin related protein 1*), que precisa ser recrutada do citosol para a mitocôndria. Este processo inicia-se com a interação da mitocôndria com o retículo endoplasmático, levando a uma constrição inicial. DRP1 é recrutada para a mitocôndria por meio de receptores presentes na membrana externa. Quando presente na superfície mitocondrial, DRP1 dá suporte a divisão mitocondrial por promover a constrição da organela (CHEN e CHAN, 2017).

Como as mitocôndrias são organelas com dupla membrana, a fusão mitocondrial ocorre em duas etapas, primeiramente a fusão da membrana externa e depois a fusão da membrana interna, formando assim, uma única matriz mitocondrial comum. Desta forma, a fusão permite que as mitocôndrias compartilhem seu conteúdo, como metabólitos, proteínas e mtDNA, assim como o gradiente eletroquímico, o que as torna eletricamente acopladas (TWIG et al. 2008). Com isso, a fusão pode ser um mecanismo pelo qual mitocôndrias intactas podem complementar uma mitocôndria danificada, de forma a recuperar sua atividade e função, mantendo a eficiência metabólica (TWIG et al. 2008).

A fusão mitocondrial requer três GTPases: MFN1 (mitofusina 1), MFN2 (mitofusina 2) e OPA1 (*dynamin-related protein optic atrophy 1*). As mitofusinas medeiam a fusão da membrana externa, enquanto OPA1 realiza a fusão da membrana interna. As mitofusinas se acumulam em áreas de contato entre duas mitocôndrias adjacentes e podem formar complexos homotípicos ou heterotípicos que levam a fusão (TILOKANI et al. 2018). A ausência dessas duas proteínas impede a etapa de fusão da membrana externa, o que é observado em células vivas e organelas isoladas (CHEN e CHAN, 2017).

1.4. MFN2

A MFN2 é uma GTPase localizada na membrana mitocondrial externa, que possui 747 resíduos de aminoácidos, em camundongos e humanos (PERNAS e SCORRANO, 2016). O gene *Mfn2*, em camundongos, é formado pela compilação de 22 éxons e está localizado no cromossomo 4. A atividade de MFN2 é rigidamente controlada, passando de um estado inativo (forma comprimida) para um estado ativo (forma estendida), através de interações intramoleculares específicas. Os níveis de MFN2 estão aumentados no coração, músculo esquelético, língua e cérebro (CHANDHOK; LAZAROU; NEUMANN, 2017).

Diferentemente de MFN1, MFN2 tem papéis celulares pleiotrópicos (SEBÁSTIAN et al. 2012), com uma contribuição relevante na regulação do metabolismo mitocondrial (CASELLAS-DÍAZ et al. 2021). Além disso, atua no transporte mitocondrial (LI et al. 2015), na atração de PARKIN para eliminação de mitocôndrias disfuncionais (CHEN e DORN, 2013), na regulação da proliferação celular, na autofagia e proteína de sinalização antiviral mitocondrial (SEBÁSTIAN et al. 2012). Com isso, disfunções no gene *Mfn2* têm sido associadas a uma ampla gama de doenças em humanos, como a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, aterosclerose e hipertensão (CHEN et al. 2014).

A MFN2 também está presente na membrana do retículo endoplasmático (ER), regulando a forma e função desta organela (SCHREPFER e SCORRANO, 2016). A formação de regiões de contato mitocôndria-ER é dependente, entre outras proteínas, da presença da MFN2 no ER, a qual forma complexos homo e heterotípicos com mitofusinas na mitocôndria. Os sítios de contato mitocôndria-ER são chamados de MERCs, os quais desempenham funções relacionadas a proliferação celular, autofagia, sinalização de cálcio, biogênese, metabolismo lipídico, resposta a proteínas desdobradas e fissão mitocondrial. A captação de cálcio pela mitocôndria é importante para manutenção da bioenergética celular e deve ser finamente regulada já que grandes oscilações podem ser nocivas (CHANDHOK; LAZAROU; NEUMANN, 2017; CASELLAS-DÍAZ et al. 2021).

Perturbações na síntese de proteínas ou na homeostase de cálcio no ER levam a uma condição conhecida como estresse do ER. Esta condição está relacionada a patologias como a diabetes, aterosclerose e Alzheimer (NGOH et al. 2012). Foi identificado que a deficiência de *Mfn2* no tecido hepático resulta em estresse do ER (SEBÁSTIAN et al. 2012), o que é explicado pelo papel chave da MFN2 na modulação da resposta a proteínas mal dobradas (UPR) e função mitocondrial (CASELLAS-DÍAZ et al. 2021).

1.5. Modelo experimental

Camundongos de diferentes linhagens apresentam variações na sequência do mtDNA, principalmente representadas por polimorfismos de sítio único (SNPs). Em comparação com camundongos C57BL/6J (BL6), o haplótipo mitocondrial presente na linhagem NZB/BINJ (NZB) contém 91 SNPs que impactam negativamente a OXPHOS, a geração de ROS e a manutenção do metabolismo energético (MORENO-LOSHUERTOS et al. 2006; LECHUGA-VIECO; JUSTO-MÉNDEZ; ENRÍQUEZ, 2020). De acordo com Moreno-Loshuertos et al. (2006), células contendo exclusivamente (homoplásmicas) mtDNA NZB apresentam menor capacidade respiratória por molécula de mtDNA e maior geração de H₂O₂ se comparado com o haplótipo BL6. Por isso, camundongos heteroplásmicos foram produzidos pela mistura de mitocôndrias com mtDNAs de origens C57BL/6J e NZB. Estes apresentam anomalias comportamentais, metabólicas e cognitivas, tendo sido utilizados como modelos de estudo de herança e doenças mitocondriais (SHARPLEY et al. 2012).

Dado que as mitocôndrias são organelas dinâmicas, compartilhando ativamente seu conteúdo, a presença de haplótipos mitocondriais distintos numa mesma célula tem sido associada a menor eficiência de OXPHOS (SHARPLEY et al. 2012). Em particular, o mtDNA NZB demonstra segregação tecido-específica em camundongos heteroplásmicos, com acentuado acúmulo em tecidos como o hepático (JENUTH et al. 1997; SHARPLEY et al. 2012; LECHUGA-VIECO et al. 2020; BATTERSBY et al. 2003; JOKINEN et al. 2015). Esse acúmulo de haplótipo mitocondrial deletério também foi observado em estudos com humanos que demonstram uma forte tendência hepática em apresentam elevados níveis de mutação no mtDNA com a idade (LI et al. 2015). Em contraposição, tecidos altamente mitóticos como o sanguíneo e baço, demonstram eliminação de mtDNA NZB com a idade. Já em tecidos pós-mitóticos como o cérebro, pulmão, coração e músculo esquelético não parece ocorrer segregação (JENUTH et al. 1997; SHARPLEY et al. 2012), muito embora a nível celular tenha sido relatada seleção. De fato, foi demonstrado que astrócitos apresentam segregação neutra e neurônios selecionam para o mtDNA NZB, conforme a idade. Um achado interessante, visto que os neurônios dependem mais de OXPHOS para desempenhar sua atividade em comparação com os astrócitos (LECHUGA-VIECO et al., 2020).

Conforme exposto acima, a fusão mitocondrial minimiza a associação entre genótipo e fenótipo mitocondrial uma vez que mistura o conteúdo de duas ou mais organelas com mtDNAs distintos – fenômeno chamado de complementação mitocondrial (CHIARATTI et al. 2018). De fato, em tecidos mitóticos em que a rede mitocondrial se fragmenta antes da

divisão celular, haplótipos mitocondriais como o NZB apresentam seleção negativa em função do tempo (BATTERSBY et al. 2005, 2003; JENUTH et al. 1997; MISHRA, CHAN, 2014). Ainda, as regiões de contato entre o ER e as mitocôndrias parecem acoplar a replicação do mtDNA, o ponto de fissão mitocondrial e a motilidade mitocondrial (LEWIS et al. 2016). Isso sugere que as MERCs tenham efeito sobre a segregação tecido-específica.

Com o objetivo de estudar esses efeitos, foi proposto realizar o nocaute fígado-específico da *Mfn2* em camundongos heteroplásmicos portadores de mtDNA NZB e BL6. Era esperado que o nocaute da *Mfn2* aumentasse a associação entre genótipo e fenótipo mitocondrial, resultando em menores níveis hepáticos de mtDNA NZB com o tempo. Mais especificamente, a falta da MFN2 deveria mitigar a fusão e complementação mitocondrial, favorecendo a eliminação autofágica de mitocôndrias com mtDNA NZB no fígado.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar o acúmulo de mtDNA NZB em camundongos heteroplásmicos BL6/NZB com nocaute fígado-específico de *Mfn2*. Com isso, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Validar o modelo nocaute fígado-específico para *Mfn2* (*Mfn2*^{-/-}) por PCR quantitativo (qPCR) por determinação do nível de expressão de *Mfn2* em comparação com os genes de referência endógenos *Rps18* e *Rpl19*.
- Determinar a porcentagem de mtDNA NZB no fígado e na cauda de animais WT e *Mfn2*^{-/-} com 100 dias de idade.
- Determinar o número total de cópias mtDNA no fígado de animais WT e *Mfn2*^{-/-} com 100 dias de idade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Acasalamento e manutenção dos animais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os regulamentos e políticas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e também foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - protocolo nº 2629090919).

A manutenção dos camundongos foi realizada de acordo com o “Guide for the Care and use of Laboratory Animals” (Garber, 2011), sendo que os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração (Presence Ratos e Camundongos, Purina), e foram mantidos à 22°C em ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro (NAGY et al. 2003).

Para a realização do nocaute de *Mfn2* no fígado, três linhagens de camundongos foram utilizadas:

- i) uma linhagem condicional nocaute que apresenta o éxon 6 do *Mfn2* flanqueado por sequências LoxP (*Mfn2*^{loxP/loxP}) (CHEN et al. 2007);
- ii) uma linhagem transgênica que expressa a enzima Cre-recombinase sobre o comando do promotor do gene *Alb* (*Alb-cre*) (POSTIC et al. 1999);
- iii) uma linhagem heteroplásmica contendo 20-47% de mtDNA NZB em *background* de DNA nuclear e mitocondrial de origem BL6 (MACHADO et al. 2015).

Essas linhagens foram acasaladas de forma planejada para obtenção de animais dos grupos (Figura 1):

- i. Controle selvagem (WT), ambos os alelos do gene *Mfn2* íntegros (*Alb-cre*^{+/-}: *Mfn2*^{+/+})
- ii. Nocaute (*Mfn2*^{-/-}), ambos os alelos do gene *Mfn2* excisados no fígado (*Alb-cre*^{+/-}: *Mfn2*^{loxP/loxP}).

De acordo com Sebastián et al. (2012), o gene da albumina (*Alb*) possui alta ativação no fígado durante o período neonatal. Além disso, a expressão desse gene se restringe ao tecido hepático. Dessa forma, presume-se que a expressão de Cre-recombinase em animais com genótipo *Alb-Cre:Mfn2*^{loxP/loxP} resulte em nocaute fígado-específico do *Mfn2*.

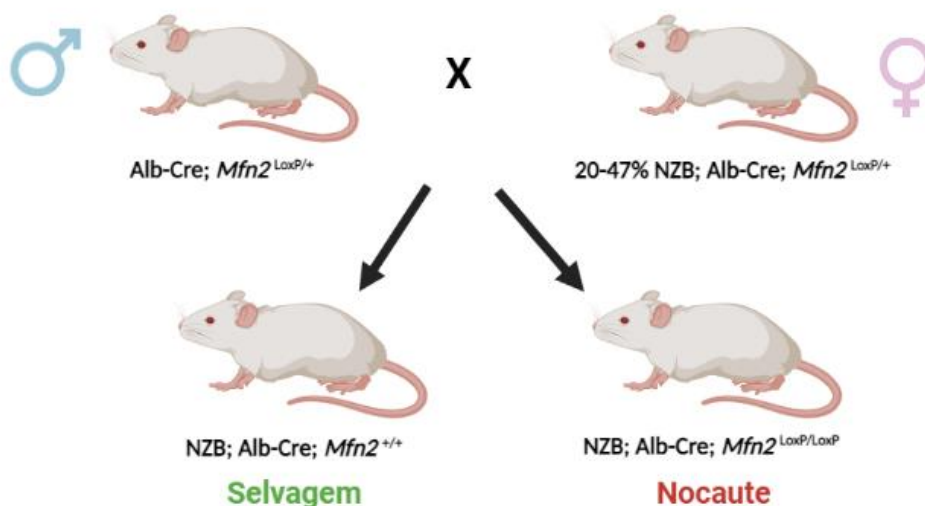


Figura 1. Obtenção dos animais dos grupos experimentais. WT: NZB, Alb-Cre, *Mfn2^{+/+}* e *Mfn2^{-/-}*: NZB, Alb-Cre, *Mfn2^{-/-}*. Elaborada pela autora.

3.2. Coleta de tecidos

Para coleta de biópsia de orelha, animais com 8-10 dias tiveram a ponta da orelha cortada conforme descrito previamente (SHARPLEY et al. 2012). Para coleta de cauda e fígado, os animais foram sacrificados com 100 dias de idade (MACHADO et al. 2015). Todos os tecidos foram armazenados em criotubos de 2 mL e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas à -80°C , até a sua utilização.

3.3. Genotipagens

Os animais foram genotipados a partir do DNA total isolado da biópsia de orelha coletada 8-10 dias após o nascimento. O protocolo foi descrito por Machado et al. (2015). Resumidamente, o tecido foi digerido por 3 h à 55°C em 200 μL de solução de digestão contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinase K (ThermoFisher Scientific). Para inativação da proteinase K, as amostras foram incubadas durante 20 min à 95°C , e posteriormente armazenadas à -20°C até a utilização.

Conforme descrito por Chen et al. (2007), a confirmação dos alelos selvagem e excisado para o gene *Mfn2* foi realizada por PCR convencional. A confirmação do transgene *Alb-Cre* foi realizada de acordo com o proposto por The Jackson Laboratory (stock No 3574). As amostras previamente congeladas foram descongeladas e centrifugadas à $10.000 \times g$ por 5 min, e então diluídas 5 vezes em água. Aplicou-se em cada tubo de reação de PCR 5 μl da amostra diluída e 10 μl do mix de reação contendo 300 nM dos *primers* F (senso) e R (anti-

senso), 2,2 µl de água e 7,5 µl de JumpStart (Sigma-Aldrich). A sequência dos *primers* utilizados é apresentada na Tabela 1. A PCR foi realizada considerando 30 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 3 s, 75°C por 63 s, seguido de um único passo à 72°C por 5 min. Ao término, as amostras foram mantidas à 4°C e visualizadas após eletroforese em gel de agarose 2%, com o auxílio do corante Sybr Safe (ThermoFisher Scientific).

Gene alvo	<i>Primer</i> senso	<i>Primer</i> anti-senso
<i>Mfn2</i> LoxP	GAAGTAGGCAGTCTCCATCG	AACATCGCTCAGCCTGAACC
<i>Mfn2</i> Excisado	TGTTGGCAAGAAGCAGGACA	AGAAGAGCATGTGTGCTCCC
<i>Alb-Cre</i> Controle Interno	ACGCGTTAATGGCTAATCGC	GGCGCTAAGGATGACTCTGG
<i>Alb – Cre</i>	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para genotipagem dos animais.

3.4. Análise da heteroplasmia e número de cópias de mtDNA

A análise da cauda e fígado foi realizada conforme o protocolo de Machado et al. (2015). Resumidamente, os tecidos foram submetidos a digestão durante 3 h por 55°C em 500 µL de solução de digestão contendo 0,4 mg/mL de proteinase K. A remoção da proteína e lipídios foi realizada mediante a utilização de duas soluções contendo 25:24:1 de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Sigma-Aldrich), e posteriormente 24:1 de clorofórmio/álcool isoamílico (Sigma-Aldrich). Para a precipitação do DNA foi necessária a utilização de álcool isopropílico 100% (Sigma-Aldrich), seguida de lavagem com etanol 70% (Sigma-Aldrich) e, por final, eluição em água ultrapura (ThermoFisher Scientific). A determinação da concentração de DNA foi realizada por espectroscopia de UV em NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

Para a determinação da porcentagem de mtDNA NZB, foi seguido o protocolo descrito por Machado et al. (2015). Em resumo, para cada amostra foram realizadas duas reações simultâneas de qPCR contendo 0,2 µM de *primers*, 1x SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) e 1 ng de DNA total, totalizando 15 µl de volume final. Para amplificação do fragmento de mtDNA NZB foram utilizados os *primers* ARMS22 e MT20 (que amplificam um fragmento de 118 pb específico do mtDNA NZB). Já para a amplificação do fragmento de mtDNA BL6 foi feito o uso dos *primers* ARMS2 e MT14 (que amplificam um

fragmento de 146 pb específico do mtDNA BL6), conforme a Tabela 2. A amplificação ocorreu no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Para cada amostra foi considerada a fase exponencial de amplificação na determinação dos níveis de cada haplótipo. A porcentagem de mtDNA NZB foi determinada em relação à soma das quantidades de mtDNA NZB e BL6 (MACHADO et al. 2015).

Gene alvo	<i>Primer senso</i>	<i>Primer anti-senso</i>
ARMS 2/14	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC	CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGTC
ARMS 20/22	TGGCACTCCCGCTGTAAAAA	TTATCCACGCTTCCGTTACGTC

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizados para determinar o nível de NZB nos tecidos.

Para determinação do número de cópias total de mtDNA por célula, foi utilizado o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System, como descrito por Machado e colaboradores (2015). Para isso, foi realizada a amplificação paralela por qPCR de um fragmento de mtDNA, parte de gene *mt-Ndl*, através do *primer mt-Ndl* (Tabela 3), juntamente à amplificação do gene nuclear de cópia única *Apob*, o qual foi empregado para normalização do número de cópias de mtDNA por célula. Para tanto, foi considerado que duas cópias do gene *Apob* estão presentes por célula (MACHADO et al. 2015).

Gene alvo	<i>Primer senso</i>	<i>Primer anti-senso</i>
<i>mt-Ndl</i>	TCCGAGCATCTTATCCACGC	GTATGGTGGTACTCCCGCTG
<i>Apob</i>	CACGTGGGCTCCAGCATT	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados para quantificar o número de cópias de mtDNA presente nos tecidos.

3.5. Expressão gênica

Para a extração do RNA total foi seguido o proposto por Macabelli et al. (2014), com algumas modificações. Em resumo, o tecido foi macerado na presença de nitrogênio líquido e posteriormente transferido para um tubo onde foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific) e 50 µl de H₂O DEPC (ThermoFisher Scientific). O tubo foi invertido e após 1 min foi adicionado 200 µL de clorofórmio, responsável pela separação da fase aquosa e orgânica. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 12.000 x g por 15 min à 4°C. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado por adição de 1,5 mL de álcool isopropílico

e posteriormente foi realizada outra centrifugação a 12.000 x g durante 10 min à 4°C. A lavagem do pellet de RNA utilizou 1 mL de etanol 75% e este foi novamente centrifugado a 7.500 x g durante 5 min à 4°C. O etanol 75% foi removido para que o pellet fosse eluído em 50 µL de H₂O DEPC.

O RNA total extraído foi tratado para eliminar o DNA contaminante, utilizando DNase I e 1 U/µL de RNaseOUT. Em seguida, o RNA total foi convertido a cDNA utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific). O cDNA foi armazenado à -20°C até sua utilização.

Para o desenho de *primers* foi utilizada a ferramenta Primer-BLAST (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Somente *primers* com anelamento sobre junções éxon-éxon foram utilizados, evitando desta maneira a amplificação de DNA genômico (Tabela 4).

Gene alvo	<i>Primer</i> senso	<i>Primer</i> anti-senso
<i>Rps18</i>	ACTTTTGGGGCCTTCGTGTC	GCAAAGGCCCCAGAGACTCAT
<i>Rpl19</i>	TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC	ATCAGCCCATCCTTGATCAGC
<i>Mfn2</i>	CATGAGGCCTTCCTCCTCAC	CAACTGCTCGTCCTGATGGA

Tabela 4. Sequência de *primers* para determinar a expressão gênica.

Para determinação do nível de expressão do gene alvo *Mfn2* e dos genes de referência *Rps18* e *Rpl19*, foram otimizadas as condições de amplificação através da realização de curvas de diluição dos *primers* e cDNA. Para isso, foi utilizado SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFischer Scientific) e *primers* para os três genes a concentração de 200 nM nas reações. As amostras de cDNA foram diluídas 10x em água ultrapura (ThermoFischer Scientific) e foi utilizado 2 uL da diluição por reação (volume total de 15 µL), analisadas em duplicata. As condições de ciclagem foram: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 seg e 62°C durante 1 min. Para determinar a expressão relativa do transcrito alvo, o *Ct* (*cycle threshold*) da *Mfn2* foi normalizado pela média geométrica dos *Ct*s dos genes de referência endógenos (*Rps18* e *Rpl19*), conforme descrito por Macabelli et al. (2014):

$$\text{expressão relativa} = 2^{-\Delta Ct} \quad \text{onde,} \quad \Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$$

3.6. Análise de dados

Foram utilizados 3 animais com 21 dias por grupo experimental (WT e *Mfn2*^{-/-}) para avaliação dos níveis de transcritos para o *Mfn2*.

Para análise do nível de mtDNA NZB na cauda e no fígado foram utilizados 12 a 15 animais por grupo experimental. Os grupos experimentais foram comparados quanto ao Δ NZB no fígado e cauda (SHARPLEY et al. 2012). Para cálculo do Δ NZB, o nível de mtDNA NZB na cauda de animais com 100 dias foi subtraído do nível de mtDNA NZB no fígado de animais com 100 dias (SHARPLEY et al. 2012). Alternativamente, o nível de mtDNA NZB no fígado foi normalizado pelo nível na cauda utilizando a transformação do (Δ NZB transformada) proposta por Johnston & Jones (2016) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta\text{NZB transformada} = \ln \left(\frac{h(h_0-1)}{h_0(h-1)} \right)$$

Observação: h corresponde a proporção de mtDNA NZB no fígado aos 100 dias, enquanto h₀ é a proporção inicial de NZB na cauda também aos 100 dias. Valores positivos de Δ NZB transformada indicam acúmulo de mtDNA no fígado, enquanto valores negativos indicam eliminação.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc.), com nível de significância máximo igual a 5% (erro α). Nos casos em que os dados atenderam às premissas de um teste paramétrico (homogeneidade de variâncias e distribuição normal), os grupos experimentais foram comparados por teste T. Caso contrário, eles foram comparados por teste de Wilcoxon.

4. RESULTADOS

Para estudar o possível impacto da fusão mitocondrial no acúmulo de mtDNA mutante no fígado, foi deletado condicionalmente o gene *Mfn2* (Figura 2), através da excisão do éxon 6, por meio do cruzamento de fêmeas heteroplásmicas NZB/BL6 (MACHADO et al. 2015) e *Mfn2^{loxP/+}/Alb-cre^{+/-}* com machos *Mfn2^{loxP/+}/Alb-cre^{+/-}* (POSTIC et al. 1999; CHEN et al. 2007). Obtendo-se filhotes com os seguintes genótipos de interesse *Mfn2^{+/+}/Alb-cre^{+/-}* (WT) e *Mfn2^{loxP/loxP}/Alb-cre^{+/-}* (*Mfn2^{-/-}*). O nocaute condicional foi possível porque esta linhagem contém sequências LoxP flanqueando os alelos da *Mfn2* (CHEN et al. 2007), e na presença de cre-recombinase ocorre a excisão da região flanqueada. Os animais utilizados expressavam a cre-recombinase sob o controle do promotor *Alb*, o qual é exclusivamente expresso no fígado (POSTIC et al. 1999).

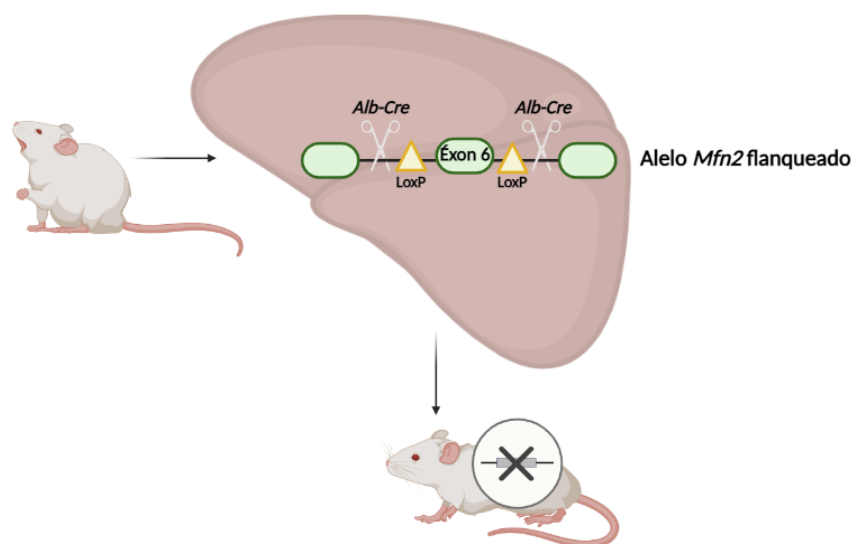


Figura 2. Deleção condicional do gene *Mfn2* no fígado. Utilizando o sistema Cre-LoxP com ativação específica no fígado, guiado pelo promotor *Alb*, foi possível deletar o éxon 6 do gene *Mfn2*, tornando-o inativo no tecido hepático. Elaborado pela autora.

Os animais previamente genotipados, conforme descrito na metodologia, foram sacrificados para a coleta de fígado e cauda. A coleta ocorreu em ambiente estéril, com a utilização de todos os equipamentos de segurança necessários. Foram coletados 12 animais do grupo WT e 15 animais do grupo *Mfn2^{-/-}*, todos com 100 dias de idade. Os animais dos grupos WT e *Mfn2^{-/-}* não apresentaram diferenças visuais quanto ao tamanho e coloração do fígado (Figura 3).

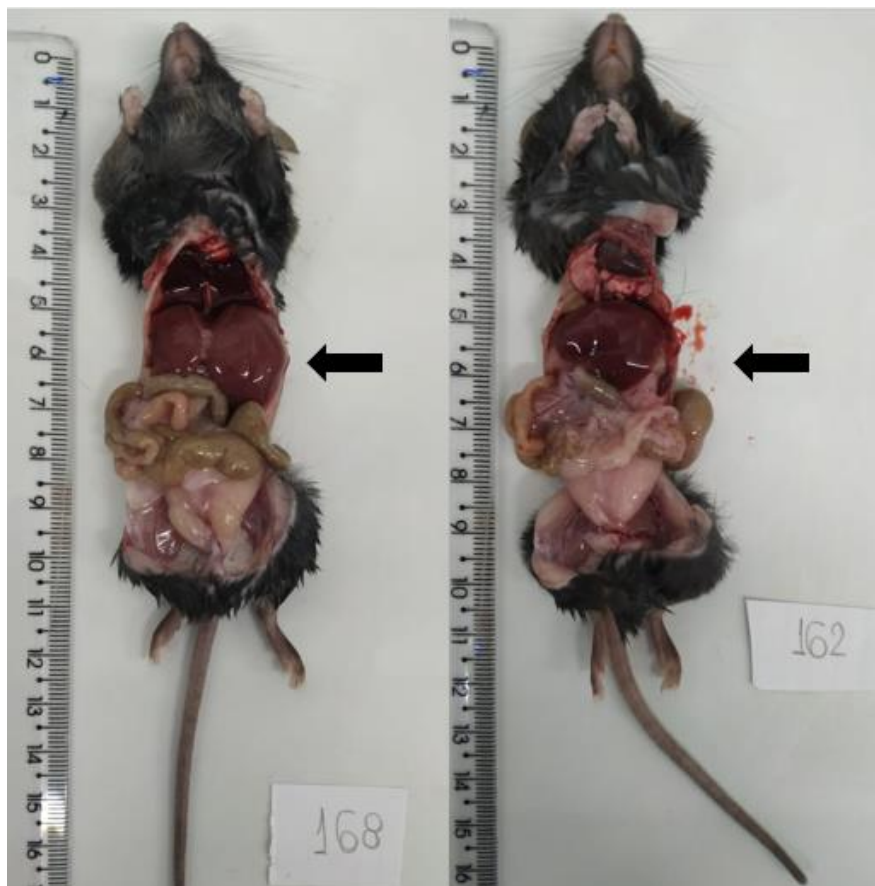


Figura 3. Coleta de tecidos de animais com 100 dias. À esquerda, o animal WT; à direita, o animal *Mfn2*^{-/-}. As setas indicam o fígado.

A seleção dos animais para cada grupo experimental, foi realizada através de genotipagem por PCR convencional utilizando a biópsia da orelha de animais de 8 dias (Figura 4). Cada número representa um animal. Na Figura 4A, podemos identificar três grupos considerando apenas a presença ou ausência de LoxP flanqueando o gene *Mfn2*: i) WT (*Mfn2*^{+/+}), para os animais 157, 167, 169 e 170; ii) heterozigoto (*Mfn2*^{+/loxP}), para os animais 159, 160, 161 e 166; e iii) *Mfn2*^{-/-} (*Mfn2*^{loxP/loxP}) para os animais 158, 162, 163, 164, 165, 168 e 171. O grupo WT apresentou banda amplificada de ~ 100 pb (indicativo do alelo *Mfn2* selvagem), enquanto animais heterozigotos apresentam duas bandas amplificadas e por fim, os animais *Mfn2*^{-/-} apresentam bandas de ~150 pb (indicativo do alelo *Mfn2* flanqueado). Na Figura 4B, podemos identificar quais animais possuem o transgene *Alb-Cre*: a primeira banda corresponde ao controle interno que é detectado por um fragmento de 324 bp. Já os animais que possuem *Alb-cre* mutante são aqueles em que é possível observar uma segunda banda no gel, com um fragmento de 225 bp. Portanto, os animais 157, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 170 e 171, correspondem aos animais que contêm o transgene *Alb-Cre* que possibilitará a recombinação de sítios LoxP e excisão do éxon 6 de *Mfn2*.

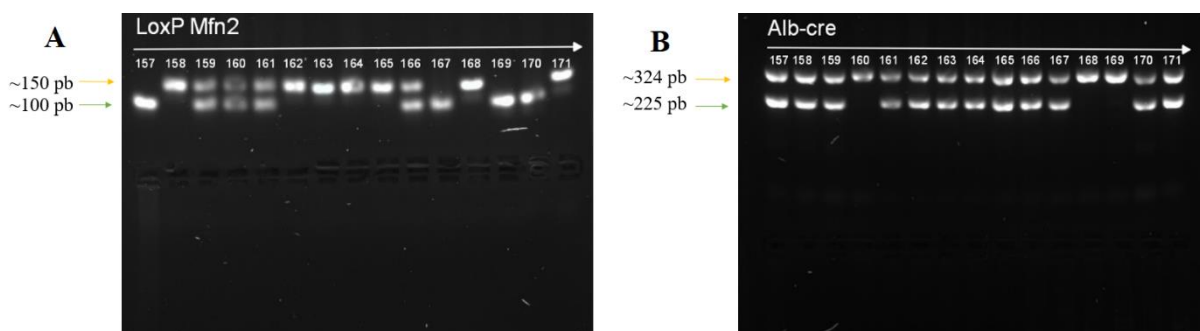


Figura 4. Seleção dos animais para os grupos experimentais (WT e *Mfn2*^{-/-}). (A) A presença de sítios loxP flanqueando o éxon 6 do gene *Mfn2* resulta em um fragmento de ~ 150 pb. Já os animais WT que não apresentam o gene *Mfn2* flanqueado pelos sítios loxP apresentam um fragmento de ~ 100 pb. (B) O controle interno para *Alb-Cre* é detectado por um fragmento 324 bp. Já os animais que contêm o transgene *Alb-Cre*, que possibilitará a recombinação de sítios LoxP e excisão do éxon 6 de *Mfn2*, apresentam uma segunda banda de 225 bp.

Para confirmar a eficiência do nocaute condicional de *Mfn2* no fígado, três animais de 21 dias por grupo experimental foram utilizados para determinação do nível de expressão dos genes *Mfn2*, *Rps18* e *Rpl19* por qPCR. Os genes de referência endógenos escolhidos (*Rps18* e *Rpl19*) codificam para proteínas ribossomais, portanto, são caracterizados pela sua expressão constitutiva e estável. Os cálculos de expressão relativa demonstraram que o gene *Mfn2* era expresso 9,8 vezes menos no grupo *Mfn2*^{-/-}, em comparação com o WT (Figura 5). Ou seja, os transcritos deste gene estavam significativamente reduzidos no fígado, indicando que o gene neste tecido foi nocauteado com sucesso. Com isso, o sucesso do modelo de nocaute fígado-específico foi confirmado para este estudo.

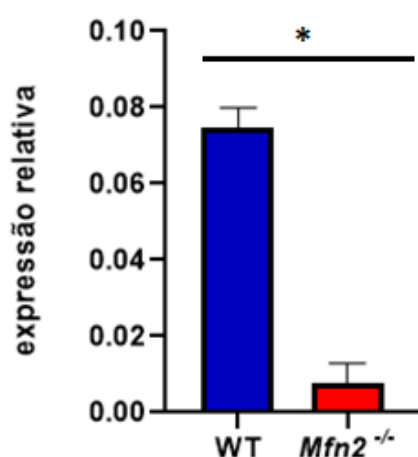


Figura 5. Análise da expressão gênica por qPCR. Expressão relativa do gene *Mfn2* em comparação com dois endógenos, *Rps18* e *Rpl19*. *Indica diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$). Elaborado pela autora.

Após confirmação do modelo experimental, os níveis de mtDNA NZB foram investigados por meio da utilização da cauda de animais de 100 dias (Figura 6). Não foi verificada diferença estatística ($P = 0,70$) quanto ao nível de mtDNA NZB na cauda entre os

grupos WT ($19,3\% \pm 3,29$) e o $Mfn2^{-/-}$ ($17,7\% \pm 2,57$). Conforme a literatura, os níveis de mtDNA NZB na cauda se mantêm estáveis ao longo da vida do animal (JENUTH et al. 1997; SHARPLEY et al. 2012) possibilitando que a cauda seja utilizada como indicador confiável dos níveis iniciais de mtDNA NZB em relação aos diferentes tecidos do animal (JENUTH et al. 1997).

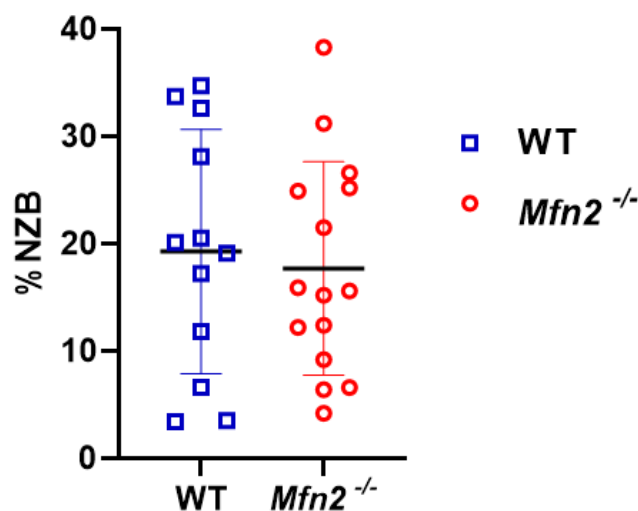


Figura 6. Determinação do nível de mtDNA NZB na cauda. Nível de mtDNA NZB (%) na cauda de animais com 100 dias de idade, grupos WT (n= 12 animais) e $Mfn2^{-/-}$ (n= 15 animais). Os grupos não diferiram estatisticamente ($P = 0,70$). Cada ponto (quadrado ou círculo) indica um animal, enquanto as barras indicam a média. Elaborado pela autora.

Posteriormente, os níveis de mtDNA NZB foram acessados no fígado de animais de 100 dias. Resultado similar ao anterior foi observado, pois a análise do nível de mtDNA NZB no fígado também não gerou diferença estatística significativa ($P = 0,77$): animais WT apresentaram $36,6\% \pm 5,18$, enquanto animais $Mfn2^{-/-}$ apresentaram $34,7\% \pm 3,91$ (Figura 7).

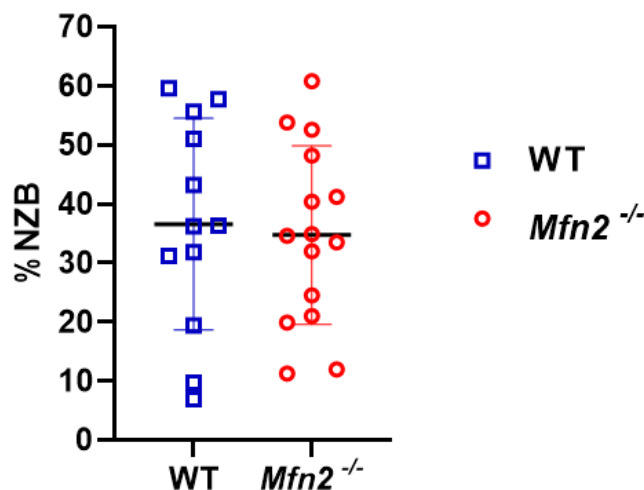


Figura 7. O nocaute de $Mfn2$ não interfere sobre o acúmulo de mtDNA NZB no fígado. Foram utilizados animais com 100 dias de idade: grupos WT (n= 12 animais) e $Mfn2^{-/-}$ (n= 15 animais). Os grupos não diferiram estatisticamente ($P = 0,77$). Cada ponto (quadrado ou círculo) indica um animal, enquanto as barras indicam a média. Elaborado pela autora.

Para complementar essa análise avaliou-se ainda o número total de cópias de mtDNA por hepatócito, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P = 0,61$): animais WT apresentaram 5.035 ± 610 , enquanto animais $Mfn2^{-/-}$ apresentaram 5.065 ± 389 (Figura 8).

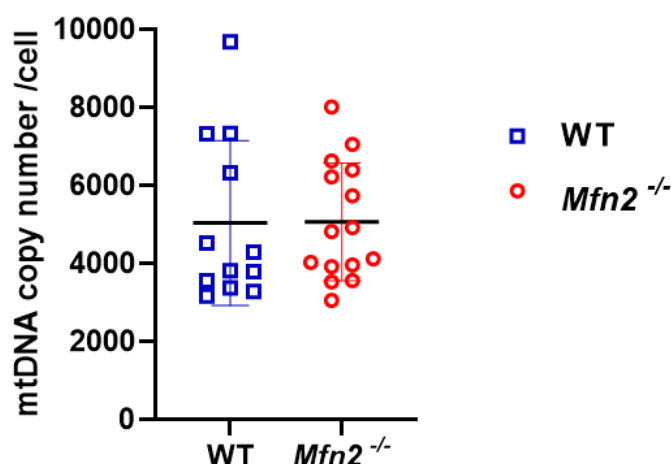


Figura 8. O nocaute de *Mfn2* não interfere sobre o número de cópias de mtDNA total no fígado. Foram utilizados animais com 100 dias de idade: grupos WT (n= 12 animais) e $Mfn2^{-/-}$ (n= 15 animais). Os grupos não diferiram estatisticamente ($P = 0,61$). Cada ponto (quadrado ou círculo) indica um animal, enquanto as barras indicam a média. Elaborado pela autora.

Uma vez que os níveis de mtDNA NZB no fígado dependem dos níveis iniciais desse haplótipo no animal, os níveis na cauda foram utilizados como um fator de normalização. Inicialmente isso foi realizado pelo cálculo do Δ NZB, o qual expressa a diferença nos níveis de mtDNA NZB entre esses dois tecidos. O Δ NZB não diferiu entre os grupos experimentais e foi em média igual a 17,3% em animais WT e 17,0% em animais $Mfn2^{-/-}$ (Figura 9). Esses dados indicam, portanto, um aumento de aproximadamente 17% nos níveis de mtDNA NZB em relação ao nível inicialmente presente nos animais, aumento este que independe da expressão de *Mfn2*.

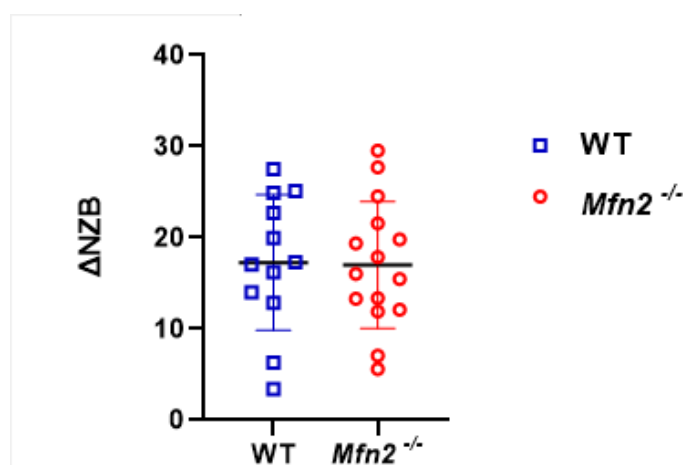


Figura 9. O nocaute de *Mfn2* não interfere sobre a diferença no nível de NZB (Δ NZB) entre o fígado e cauda. Foram utilizados animais com 100 dias de idade: grupos WT (n= 12 animais) e $Mfn2^{-/-}$ (n= 15 animais). Os grupos

não diferiram estatisticamente ($P = 0,93$). Cada ponto (quadrado ou círculo) indica um animal, enquanto as barras indicam a média. Elaborado pela autora.

Uma segunda correção dos valores de mtDNA NZB no fígado também foi utilizada considerando o Δ NZB transformado. Essa transformação é baseada no trabalho de Johnston & Jones (2016), os quais propuseram uma normalização mais robusta também baseada no valor de mtDNA NZB na cauda. Mais uma vez os dados obtidos confirmaram a ausência de efeito do nocaute do gene *Mfn2* sobre o acúmulo hepático de mtDNA NZB (Figura 10).

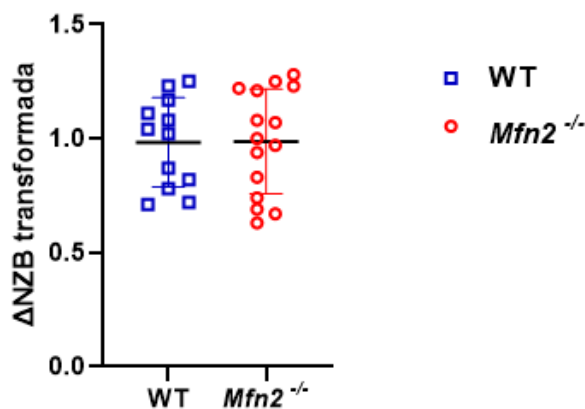


Figura 10. O nocaute de *Mfn2* não interfere sobre a diferença no nível de NZB (Δ NZB transformado) entre o fígado e cauda. Foram utilizados animais com 100 dias de idade: grupos WT (n= 12 animais) e *Mfn2*^{-/-} (n= 15 animais). Os grupos não diferiram estatisticamente ($P = 0,96$). Cada ponto (quadrado ou círculo) indica um animal, enquanto as barras indicam a média. Elaborado pela autora.

5. DISCUSSÃO

Aqui propomos analisar se o nocaute condicional de *Mfn2* influencia no acúmulo de mtDNA NZB no fígado de camundongos heteroplásmicos. Isso porque, a instabilidade dos níveis de mtDNA em tecidos que selecionam progressivamente um haplótipo mitocondrial já foi descrita por Jenuth et al. (1997) e foi sustentada por outros trabalhos, Sharpley et al. (2012), Burgstaller et al. (2014), Takeda et al. (2000), Lechuga-Vieco et al. (2020). Ademais, vários estudos associam variantes humanas não patológicas do mtDNA a doenças como Alzheimer, doença de Huntington, Parkinson, esclerose múltipla, diabetes tipo 2 e câncer (LECHUGA-VIECO; JUSTO-MÉNDEZ; ENRÍQUEZ, 2020).

A indução do nocaute fígado-específico através do sistema *Alb-Cre-LoxP* foi descrita primeiramente por Postic et al. (1999) e vem sendo amplamente utilizada para estudar o impacto da perda de genes específicos no tecido hepático de camundongos (SEBÁSTIAN et al. 2012; MAKINO et al. 2018; LI et al. 2019; GREENHALGH et al. 2019; WANG et al. 2019). Este é um modelo robusto de deleção condicional, visto que o gene *Alb* (albumina) possui alta ativação durante o período neonatal em células hepáticas (SEBÁSTIAN et al. 2012).

A confirmação do modelo nocaute condicional foi realizada por meio da análise da expressão gênica por qPCR em animais de 21 dias e também pela genotipagem por PCR convencional com animais de 8 dias. Os resultados comprovaram a eficácia do nocaute, em que foi observado a redução dos níveis de transcritos do *Mfn2* (Figura 5). Isso permitiu que os animais fossem separados em dois grupos: (i) WT, que possuía alelos selvagens para *Mfn2* e (ii) *Mfn2*^{-/-}, onde o gene *Mfn2* estava flanqueado por sequências LoxP em todos os tecidos.

Os animais foram eutanasiados, a coleta de tecidos realizada e não foi observada nenhuma anormalidade morfológica aparente no fígado dos animais WT e *Mfn2*^{-/-} de 100 dias (Figura 3). Por outro lado, o trabalho de Sebastian et al. (2012), que também utilizou o sistema *Alb-Cre-LoxP* para deletar *Mfn2* no fígado, identificou importantes alterações na função hepática. Através do isolamento de hepatócitos e análise em microscopia confocal, foi observado que em camundongos *Mfn2*^{-/-} houve formação de aglomerados mitocondriais, ao contrário da condição normal que exibe uma morfologia alongada. Também foi visto um aumento na quantidade de mitocôndrias esféricas nestes camundongos. Além disto, a ablação de *Mfn2* no fígado levou a disfunção mitocondrial, diminuição da atividade respiratória e aumento da concentração de H₂O₂. Esses achados ressaltam a importância de *Mfn2* no tecido hepático, atuando na regulação da fusão e função mitocondrial (CHEN e CHAN, 2017), na

interação e controle da função do ER (NGOH et al. 2012; SCHREPFER e SCORRANO, 2016; CASELLAS-DÍAZ et al. 2021) e também no controle de qualidade mitocondrial (TWIG et al. 2008; CHANDHOK; LAZAROU; NEUMANN, 2017). Não foi possível analisar microscopicamente os tecidos dos animais deste projeto em decorrência do isolamento social frente a atual pandemia de COVID-19.

Diversos autores vêm estudando extensivamente a segregação de mtDNA no fígado de camundongos e humanos, conforme a idade (JENUTH et al. 1997; LI et al. 2015, NAUE et al. 2015, BATTERSBY et al. 2003 SHARPLEY et al. 2012, BURGSTALLER et al. 2014, LECHUGA-VIECO et al. 2020). Os achados de Machado et al. (2015) revelaram que camundongos heteroplásmicos envelhecidos por ~120 dias, apresentaram forte acúmulo de mtDNA NZB no fígado, em contraste com tecidos que apresentam segregação neutra como o coração e o cérebro.

Os dados deste projeto indicam que independentemente da expressão de *Mfn2*, o acúmulo de mtDNA NZB continuou acontecendo no fígado. Portanto, ao contrário do que pensávamos, o nocaute condicional de *Mfn2* não diminuiu a segregação específica de NZB que acontece no tecido hepático. De fato, foi observado um aumento de aproximadamente 17% nos níveis de mtDNA NZB em relação ao nível inicial presente nos animais, aumento este que independe da expressão de *Mfn2* (Figura 6). Os resultados sobre o número de cópias total de mtDNA (Figura 7) e a normalização através do Δ NZB transformado (Figura 8), reforçaram que não há efeito do nocaute de *Mfn2* sobre o acúmulo hepático de mtDNA NZB.

Malena et al. (2009) utilizaram modelo celular contendo a variante patológica do mtDNA A3243G e realizaram o silenciamento por RNA de interferência de *Opal*, responsável pela fusão das membranas internas. Os resultados apontaram que o silenciamento de *Opal* não afetou a segregação de mtDNA mutante. Mas, este mesmo estudo identificou que a diminuição da fissão mitocondrial favorece a seleção de mtDNA mutante. Através do silenciamento dos genes *Drp1* e *Fis1*, foi observado que o nível de mtDNA mutante aumentou em comparação com o mtDNA selvagem (MALENA et al. 2009). Esses resultados sugerem que a fissão mitocondrial possivelmente desempenha um papel-chave na segregação do mtDNA mutante.

Porém, já foi descrito que a segregação de variantes do mtDNA em células cultivadas, é altamente variável e não consegue replicar os padrões observados *in vivo*, tanto em camundongos quanto em humanos (JOKINEN; BATTERSBY, 2012). Por isso, o trabalho de Battersby et al. (2016) que utilizou modelo animal, fornece dados mais próximos dos encontrados neste projeto. Os pesquisadores realizaram o nocaute de *Drp1* em camundongos e

observaram que não houve interferência no acúmulo de mtDNA NZB no fígado desses animais. Esses achados em conjunto, dos trabalhos de Malena et al. (2009), Battersby et al. (2016) e os dados do nosso projeto, sugerem que a dinâmica mitocondrial (fissão e fusão) parece não ser fundamental para a segregação tecido-específica do mtDNA.

Entretanto, sabe-se que uma das funções críticas de *Mfn2* é sua interação com o ER, promovendo o funcionamento adequado de mitocôndrias e ER (SCHREPFER e SCORRANO, 2016; CASELLAS-DÍAZ et al. 2021). Os sítios de contato entre ambas organelas foram relacionados à replicação e manutenção do mtDNA e também ao ponto de fissão mitocondrial (Lewis et al. 2016). Nós acreditávamos que a interação entre ER e mitocôndrias poderia estar relacionada com a segregação específica de mtDNA no fígado, e por isso foi realizada a ablação de *Mfn2* hepática. Contudo, os resultados encontrados neste projeto indicam que o nocaute de *Mfn2* no fígado não interfere no acúmulo de mtDNA NZB (Figura 7). Não foi investigado o impacto da ablação de *Mfn2* no fígado em relação à comunicação e funcionamento do ER neste trabalho, pois já foi demonstrado na literatura que importantes alterações, como aumento acentuado de marcadores de estresse no ER (SEBÁSTIAN et al. 2012).

O tecido hepático é caracterizado por intensa atividade metabólica e alta renovação celular. Por isso, Lechuga-Vieco e colaboradores (2020) sugeriram que o viés de segregação para tecidos somáticos depende do impacto do haplótipo mitocondrial para o desempenho de OXPHOS. Nesse sentido, os pesquisadores identificaram que a preferência por um haplótipo de mtDNA ocorre de acordo com “a arquitetura metabólica da célula”. De fato, foi visto que o aumento da taxa de proliferação do fígado acelerou o acúmulo de NZB neste tecido, o que sugere fortemente que o viés de segregação para NZB é uma propriedade intrínseca dos hepatócitos (LECHUGA-VIECO et al. 2020). Nós propomos que MFN2, pelo seu papel importante na fusão e complementação mitocondrial, bem como na interação com o ER, poderia ser uma proteína chave para explicar o viés de segregação no tecido hepático. Os resultados contrariam nossa hipótese, mas podem fornecer dados para pesquisas futuras na tentativa de elucidar este fenômeno.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados indicam que a ablação de *Mfn2* não interfere na seleção positiva de mtDNA NZB no fígado. O acúmulo continua acontecendo mesmo na ausência deste gene. Com base nisso, é possível descartar a hipótese de que o nocaute de *Mfn2* no fígado dirige o mecanismo de seleção de mtDNA mutante neste tecido, sugerindo que a dinâmica mitocondrial não é essencial para a segregação tecido-específica (MALENA et al. 2009; BATTERSBY et al. 2016).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

CASELLAS-DÍAZ, Sergi; LARRAMONA-ARCAS, Raquel; RIQUÉ-PUJOL, Guillem; TENA-MORRAJA, Paula; MÜLLER-SÁNCHEZ, Claudia; SEGARRA-MONDEJAR, Marc; GAVALDÀ-NAVARRO, Aleix; VILLARROYA, Francesc; REINA, Manuel; MARTÍNEZ-ESTRADA, Ofelia M. **Mfn2 localization in the ER is necessary for its bioenergetic function and neuritic development.** *Embo Reports*, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 1-10, 23 jul. 2021. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/embr.202051954>.

CHANDHOK, Gursimran; LAZAROU, Michael; NEUMANN, Brent. **Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease.** *Biological Reviews*, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 933-949, 25 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12378>

CHEN, H., McCAFFERY, J.M., CHAN, D.C., **Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum.** *Cell* 130, 548–62.

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

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

CHIARATTI, Marcos Roberto; GARCIA, Bruna Martins; CARVALHO, Karen Freire; MACHADO, Thiago Simões; RIBEIRO, Fernanda Karina da Silva; MACABELLI, Carolina Habermann. **The role of mitochondria in the female germline: implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases.** *Cell Biology International*, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 711-724, 1 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.10947>.

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

GARBER, J.C., 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Press, Washington.

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

GREENHALGH, Stephen N.; MATCHETT, Kylie P.; TAYLOR, Richard S.; HUANG, Katherine; LI, John T.; SAETEURN, Koy; DONNELLY, Mhairi C.; SIMPSON, Eilidh E.M.; POLLACK, Joshua L.; ATAKILIT, Amha. Loss of Integrin $\alpha v \beta 8$ in Murine Hepatocytes Accelerates Liver Regeneration. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 189, n. 2, p. 258-271, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.10.007>.

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

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

JOKINEN, Riikka; BATTERSBY, Brendan J.. **Insight into mammalian mitochondrial DNA segregation**. **Annals Of Medicine**, v. 45, n. 2, p. 149-155, 9 jul. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07853890.2012.693190>.

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

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

LECHUGA-VIECO, Ana Victoria; JUSTO-MÉNDEZ, Raquel; ENRÍQUEZ, José Antonio. **Not all mitochondrial DNAs are made equal and the nucleus knows it**. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 511-529, 25 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2434>.

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

LEWIS, S.C., Uchiyama, L.F., Nunnari, J., 2016. **ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells.** *Science* 353, aaf5549.

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

LI, Minle; LU, Ying; LI, Yakui; TONG, Lingfeng; GU, Xiao-Chuan; MENG, Jian; ZHU, Yemin; WU, Lifang; FENG, Ming; TIAN, Na. **Transketolase Deficiency Protects the Liver from DNA Damage by Increasing Levels of Ribose 5-Phosphate and Nucleotides.** *Cancer Research*, [S.L.], v. 79, n. 14, p. 3689-3701, 17 maio 2019. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3776>.

MACABELLI, Carolina Habermann; FERREIRA, Roberta Machado; GIMENES, Lindsay Unno; CARVALHO, Nelcio Antonio Tonizza de; SOARES, Júlia Gleyci; AYRES, Henderson; FERRAZ, Márcio Leão; WATANABE, Yeda Fumie; WATANABE, Osnir Yoshime; SANGALLI, Juliano Rodrigues. **Reference Gene Selection for Gene Expression Analysis of Oocytes Collected from Dairy Cattle and Buffaloes during Winter and Summer.** *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 93287, 27 mar. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093287>

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

MAKINO, Yuki; HIKITA, Hayato; KODAMA, Takahiro; SHIGEKAWA, Minoru; YAMADA, Ryoko; SAKAMORI, Ryotaro; EGUCHI, Hidetoshi; MORII, Eiichi; YOKOI, Hideki; MUKOYAMA, Masashi. **CTGF Mediates Tumor–Stroma Interactions between Hepatoma Cells and Hepatic Stellate Cells to Accelerate HCC Progression.** *Cancer Research*, [S.L.], v. 78, n. 17, p. 4902-4914, 2 jul. 2018. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-3844>.

MALENA, Adriana; LORO, Emanuele; RE, Miriam di; HOLT, Ian J.; VERGANI, Lodovica. **Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA.** *Human Molecular Genetics*, [S.L.], v. 18, n. 18, p. 3407-3416, 27 jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp281>.

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

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

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

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

NGOH, Gladys A.; PAPANICOLAOU, Kyriakos N.; WALSH, Kenneth. **Loss of Mitofusin 2 Promotes Endoplasmic Reticulum Stress.** *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 287, n. 24, p. 20321-20332, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112.359174>

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

PEREIRA, Claudia V.; GITSCHLAG, Bryan L.; PATEL, Maulik R.. **Cellular mechanisms of mtDNA heteroplasmy dynamics.** *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 56, n. 5, p. 510-525, 13 jun. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10409238.2021.1934812>.

PERNAS, Lena; SCORRANO, Luca. **Mito-Morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function.** *Annual Review Of Physiology*, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 505-531, 10 fev. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011>.

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

SATO, Akitsugu; NAKADA, Kazuto; HAYASHI, Jun-Ichi. **Mitochondrial dynamics and aging: mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtdna.** Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research, [S.L.], v. 1763, n. 5-6, p. 473-481, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.001>

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

SEBASTIAN, D.; HERNANDEZ-ALVAREZ, M. I.; SEGALES, J.; SORIANELLO, E.; MUNOZ, J. P.; SALA, D.; WAGET, A.; LIESA, M.; PAZ, J. C.; GOPALACHARYULU, P.. **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, [S.L.], v. 109, n. 14, p. 5523-5528, 16 mar. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1108220109>.

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

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

SU, Bo et al.. **Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases.** Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease, v. 1802, n. 1, p. 135-142, jan. 2010

TAKEDA, K et al. **Replicative advantage and tissue-specific segregation of RR mitochondrial DNA between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice.** Genetics vol. 155,2 (2000): 777-83.

TILOKANI, Lisa; NAGASHIMA, Shun; PAUPE, Vincent; PRUDENT, Julien. **Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms**. *Essays In Biochemistry*, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 341-360, 20 jul. 2018. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20170104>.

TWIG, Gilad; ELORZA, Alvaro; A MOLINA, Anthony J; MOHAMED, Hibo; WIKSTROM, Jakob D; WALZER, Gil; STILES, Linsey; HAIGH, Sarah e; KATZ, Steve; LAS, Guy. **Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy**. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 433-446, 17 jan. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>.

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

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

WANG, Chia-Yu; XIAO, Xia; BAYER, Abraham; XU, Yang; DEV, Som; CANALI, Susanna; NAIR, Anil V.; MASIA, Ricard; BABITT, Jodie L.. **Ablation of Hepatocyte Smad1 , Smad5, and Smad8 Causes Severe Tissue Iron Loading and Liver Fibrosis in Mice**. *Hepatology*, [S.L.], v. 70, n. 6, p. 1986-2002, 13 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.30780>.