

**Universidade Federal de São Carlos**

Departamento de Genética e Evolução

Karen Freire Carvalho

**Efeito do *knockout* da Mitofusina 1 sobre a  
fertilidade de oócitos murinos**

**São Carlos**

**2018**

KAREN FREIRE CARVALHO

**Efeito do *knockout* da Mitofusina 1 sobre a fertilidade de oócitos murinos**

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

**Departamento:**

Genética e Evolução

**Área de concentração:**

Bioquímica e Biologia Molecular

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

**Folha de Aprovação**

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Karen Freire Carvalho, realizada em 31/08/2018:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti  
UFSCar

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira  
USP

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda  
UEL

# **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha família, principalmente à minha mãe, por todo o carinho, cuidado e apoio que sempre me deram. Minha mãe é meu exemplo maior de amor, força de vontade e bondade, valores que espero nunca perder.

Agradeço aos meus sobrinhos Nenagh e Tomás, por me lembrarem que finais de semana são mais proveitosos se estiverem cheios de risadas e brincadeiras.

Agradeço à minha pequena e fiel companheira felina, Marie Curie, por todo o carinho,

Ao meu melhor amigo, Rodrigo Guedes Lang, pelo amor incondicional e pela companhia e compreensão que só ele sabe oferecer,

Aos meus amigos de infância (Tamara Oliveira, Bruna Troca, Letícia Tiburcio, Victor Hugo Sampaio e Luiz Paulo Brianezi) que com certeza são responsáveis por eu ser quem sou hoje,

Aos amigos que a USP me trouxe, os ADS, que são a parte exata (e necessária) da minha vida,

Aos amigos que a UFSCar me trouxe, principalmente Rebeca Cordellini, Juliana Virgínio e Rodrigo Odone, sem vocês os quatro anos de bacharelado na UFSCar não teriam sido tão especiais,

Aos amigos que a pós graduação me trouxe, no LAGENBIO e no DGE, especialmente à Bruna Martins Garcia por estar sempre ao meu lado, passando pelos mesmos perrengues e mesmo assim me fazendo rir sempre; ao Thiago Simões Machado pelo companheirismo e ao Caio Oliveira que, apesar de também se encaixar no ADS e nos amigos que a graduação me trouxe, teve um papel fundamental durante a pós graduação, sendo companhia indispensável para o almoço e para o docinho da sobremesa.

Gostaria de agradecer também às pessoas especiais que conheci no Canadá (Sara Tracy, Karl Vieux, Sibat Anam, Laleh Abassi, Herthana Kan, Sofia Granados, Ryan Rys, Francis McEachern, Boyan Woychyshyn, Katarina Pessina and Heather Duncan) por me mostrarem que amizades não precisam de longos anos pra se solidificarem.

Reservo um agradecimento especial ao Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti e ao Prof. Dr. Hugh Clarke que não mediram esforços para me orientar e sem dúvida alguma me ensinaram muito mais que ciência, mas também valores, e se tornaram amigos que pretendo levar pro resto da vida.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse projeto, seja auxiliando em experimentos ou discutindo ideias,

Agradeço também à Universidade Federal de São Carlos,

ao Departamento de Genética e Evolução,

ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular,

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2012/50231-6, 2016/11942-5 e 2017/05899-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CARVALHO, K. F. Efeito do *knockout* da Mitofusina 1 sobre a fertilidade de oócitos murinos [Fertility effect of the knockout of mitofusin 1 on murine oocytes]. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

## RESUMO

A fertilidade está diretamente relacionada à competência de desenvolvimento do oócito. Nesse contexto, as mitocôndrias oocitárias desempenham um papel crucial e se tornaram um importante alvo em terapias de reprodução assistida. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a estes efeitos mitocondriais são desconhecidos. Assim sendo, as implicações da deleção da Mitofusina 1 (*Mfn1* cKO) em oócitos murinos foi investigada nesse projeto. A infertilidade de fêmeas *Mfn1* cKO foi caracterizada por interrupção no crescimento do oócito e total falha na ovulação. Em comparação com oócitos selvagens (WT), oócitos *Mfn1* cKO apresentaram mitocôndrias com ultraestrutura anormal, menor quantidade de cristas e estrutura interna vesiculada. Ensaios com incorporação de BrdU pelas células da granulosa reforçaram o fenótipo de foliculogênese bloqueada, pois o grupo *Mfn1* cKO apresentou diminuição no número de células em replicação. Além disso, foi verificado que este grupo apresenta diminuição, tanto no oócito como no ovário, na quantidade de transcritos da maior parte dos genes analisados, envolvidos com comunicação oócito-granulosa e com o controle da foliculogênese. Fatores importantes para a progressão da foliculogênese tiveram seus níveis de mRNA restaurados quando complexos granulosa-oócito (GOCs) *Mfn1* cKO foram co-cultivados com oócitos WT desnudos. Para testar a hipótese de que o efeito do cKO de *Mfn1* foi devido a um desbalanço na expressão da Mitofusina 2 (MFN2) em relação a MFN1, MFN2 ou MFN1 e MFN2 foram superexpressados durante o cultivo de GOCs. Observou-se que a superexpressão de MFN2 inibiu o crescimento do oócito, o qual foi resgatado pela superexpressão de ambas as Mitofusinas. Portanto, a infertilidade de fêmeas *Mfn1* cKO parece estar relacionada a um desbalanço na expressão de MFN1 e MFN2. Consequentemente, a deleção somente de *Mfn1* levou à inibição de vias de sinalização PI3K/AKT no oócito e também da expressão de GDF9, *Bmp15* e *Fgf8b*, resultando em bloqueio na foliculogênese, por afetar a comunicação oócito-granulosa.

**Palavras-chave:** Fertilidade, Mitocôndria, Mitofusina.

CARVALHO, K. F. Fertility effect of the knockout of mitofusin 1 on murine oocytes. [Efeito do *knockout* da Mitofusina 1 sobre a fertilidade de oócitos murinos] 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

## ABSTRACT

Fertility is directly related to oocyte developmental competence. In this context, oocyte mitochondria play a crucial role and have become an important target in assisted reproduction therapies. However, the molecular mechanisms underlying these mitochondrial effects are unknown. Therefore, the implications of the deletion of Mitofusin 1 (*Mfn1* cKO) in murine oocytes was investigated in this project. Infertility of *Mfn1* cKO females was characterized by interruption in oocyte growth and total failure in ovulation. Compared with wild type oocytes (WT), *Mfn1* cKO oocytes showed mitochondria with abnormal ultrastructure, fewer cristae and a vesicular internal structure. Assays with BrdU incorporation by the granulosa cells reinforced the phenotype of blocked folliculogenesis, since the *Mfn1* cKO group presented a decrease in the number of cells in replication. In addition, it was verified that this group shows a decrease, both in the oocyte and in the ovary, in the amount of transcripts of most genes analyzed, involved with oocyte-granulosa communication and folliculogenesis control. Important factors for the progression of folliculogenesis had their mRNA levels restored when *Mfn1* cKO granulosa-oocyte complexes (GOCs) were co-cultured with denuded WT oocytes. To test whether were due to an imbalance in the expression of Mitofusin 2 (MFN2) relative to MFN1, MFN2 or MFN1 and MFN2 were overexpressed during GOC culture. It was observed that MFN2 overexpression inhibited oocyte growth, which was rescued by overexpression of both Mitofusins. Therefore, the infertility of females *Mfn1* cKO seems to be related to an imbalance in the expression of MFN1 and MFN2. Consequently, *Mfn1* deletion led to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathways in the oocyte as well as the expression of GDF9, *Bmp15* and *Fgf8b*, resulting in folliculogenesis blockage, as it affected oocyte-granulosa communication.

**Keywords:** Fertility, Mitochondria, Mitofusin.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1. FOLICULOGÊNESE E CRESCIMENTO DO OÓCITO</b> .....	14
<b>2.2. MITOCÔNDRIAS</b> .....	18
<b>2.3. MITOCÔNDRIAS DURANTE O CRESCIMENTO DO OÓCITO</b> .....	19
<b>2.4. DINÂMICA MITOCONDRIAL</b> .....	21
<b>2.5. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DAS MITOFUSINAS</b> .....	23
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	26
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>4.1. GERAL</b> .....	26
<b>4.2. ESPECÍFICOS</b> .....	26
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>5.1. ANIMAIS</b> .....	29
<b>5.2. GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS</b> .....	29
<b>5.3. COLETA DE OÓCITOS E OVÁRIOS</b> .....	30
<b>5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b> .....	30
<b>5.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CORTES DE OVÁRIO</b> .....	30
<b>5.6. EXPRESSÃO GÊNICA</b> .....	31
<b>5.7. CO-CULTIVO</b> .....	34
<b>5.8. PLASMÍDEOS PARA SUPEREXPRESSÃO</b> .....	34
<b>5.9. COLETA, MICROINJEÇÃO DE cRNA E CULTIVO DE GOCS</b> .....	35
<b>5.10. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE OÓCITOS</b> .....	36
<b>5.11. WESTERN BLOT</b> .....	37
<b>5.12. ANÁLISE DOS DADOS</b> .....	37
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6.1. PARTE 1: KNOCKOUT CONDICIONAL DA MFN1</b> .....	40
<b>6.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	40
<b>6.1.2. Proliferação celular</b> .....	43
<b>6.1.3. Expressão gênica</b> .....	45
<b>6.1.4. Co-cultivo</b> .....	51
<b>6.2. PARTE 2: SUPEREXPRESSÃO DE MITOFUSINA 1 E 2</b> .....	54
<b>6.2.1. Coleta de GOCs, microinjeção e cultivo</b> .....	54

6.2.2. Validação do modelo .....	54
6.2.3. Crescimento e desenvolvimento do oócito .....	56
7. CONCLUSÕES .....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64



# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

O papel determinante da mitocôndria na regulação do desenvolvimento folicular e do crescimento do oócito está emergindo da pesquisa básica em espécies modelo e de estudos clínicos de infertilidade em humanos (VAN BLERKOM, 2010). Este novo ramo de pesquisa tem se dedicado a decifrar a relação entre a bioenergética e a competência de desenvolvimento do oócito, uma vez que várias anormalidades que podem levar à infertilidade, como i) segregação cromossomal desordenada (SCHON et al., 2000); ii) falhas na maturação e na fecundação (REYNIER et al., 2001); e, iii) divisão celular interrompida, citocinese anormal e fragmentação do embrião (VAN BLERKOM, 2004; MAY-PANLOUP et al., 2007; SHOUBRIDGE; WAI, 2007), se associam com distúrbios mitocondriais que comprometem a produção de ATP.

A atividade mitocondrial depende, entre outras coisas, do controle de sua dinâmica, que por sua vez é dependente dos processos de fusão e fissão, controlada por GTPases específicas pertencentes à família das proteínas relacionadas à dinamina (CHAN, 2006). O processo de fusão mitocondrial é intimamente associado com a atividade das Mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2) e à Proteína de Atrofia Ótica 1 (OPA1). Já a fissão é mediada, entre outros fatores, pela Proteína Relacionada à Dinamina 1 (DNM1I) (CHAN, 2006). UDAGAWA et al. (2014) mostraram que o *knockout* condicional de *Dnm1l* em oócitos murinos leva a intensa agregação mitocondrial com o retículo endoplasmático e com vesículas secretórias, implicando em completa infertilidade devido a defeitos na sinalização por cálcio, na comunicação intercelular por secreção e na retomada da meiose. Os autores verificaram ainda que o envelhecimento resulta em defeitos similares no oócito, o que chama a atenção para um possível papel da dinâmica mitocondrial na infertilidade devido a idade.

Estudos recentes do nosso grupo determinaram que o nocaute condicional de *Mfn1* no oócito afeta o desenvolvimento folicular, resultando em bloqueio do desenvolvimento do oócito e consequente falha na ovulação (dados não publicados). No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a essas falhas não são conhecidos. Neste sentido, o estudo desses mecanismos deve contribuir com o desenvolvimento de novas terapias visando o tratamento de infertilidade feminina

bem como no entendimento do papel exercido pela mitocôndria na determinação da competência de desenvolvimento do oócito.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FOLICULOGÊNESE E CRESCIMENTO DO OÓCITO

A foliculogênese pode ser definida como a formação, o crescimento e a maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e se estendendo até o folículo peri-ovulatório. Simultaneamente ao desenvolvimento folicular, o oócito passa por uma série de mudanças que visam estabelecer um programa molecular para a embriogênese. Esse programa inclui a replicação e a redistribuição de organelas bem como o acúmulo de uma infinidade de fatores como proteínas, RNAs, ATP, entre outros (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2013). Ao longo do desenvolvimento folicular, o suporte das células foliculares é essencial para prover o oócito com nutrientes e reguladores de crescimento (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2013). O oócito, por sua vez, desempenha um papel ativo na regulação do crescimento do folículo (SU et al., 2009). O resultado de todo este processo deve ser a ovulação de um oócito competente para ser fecundado e gerar um descendente saudável.

Durante as primeiras fases do desenvolvimento do embrião, as células germinativas primordiais (PGCs) se diferenciam e migram para a região onde se formarão as gônadas. Assim, por meio de multiplicações mitóticas sucessivas, PGCs dão origem às oogônias que iniciam o processo meiótico para gerar milhões de oócitos primários que permanecem estacionados no estágio de diplóteno da primeira prófase da meiose. Por ocasião do nascimento, esses oócitos sofrem uma redução em número e os remanescentes são revestidos por uma camada de células achatadas denominadas células da pré-granulosa (pCG), dando origem aos chamados folículos primordiais. Em mamíferos, esses folículos permanecem quiescentes por período variado de tempo, dependendo da espécie, até serem recrutados para o crescimento.

O estímulo para desenvolvimento dos folículos primordiais não é bem compreendido, mas parece ser dependente da sinalização KITL-KIT, sendo KITL um ligante produzido pelas pCG/CG e KIT um receptor de membrana do tipo tirosina quinase presente no oócito (BINELLI; MURPHY, 2010). Os primeiros sinais de ativação da foliculogênese que resultam na formação de folículos primários são caracterizados pelo crescimento do oócito e pela proliferação das pCG. Essas últimas assumem formato cuboide, passando então a serem chamadas de células



da granulosa (CG), e recobrem, ainda em uma única camada, o oócito. No gameta, por sua vez, Pi3K é diretamente ativada por KIT e passa a fosforilar PIP2 a PIP3, o que recruta Akt e PDK1 para a membrana citoplasmática. PDK1 fosforila e ativa Akt, que acaba promovendo crescimento celular e síntese proteica pois ativa mTOR pela fosforilação de TSC1/TSC2. mTOR é composto por dois complexos distintos: mTORC1 e mTORC2. mTORC1 integra sinalização de fatores de crescimento, disponibilidade de nutrientes e de oxigênio, por exemplo, para regular síntese de proteínas e de lipídeos (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014). Já mTORC2 está relacionado ao controle de proliferação e metabolismo celular e tem como um de seus substratos diretos, Akt (LAPLANTE; SABATINI, 2012; MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014).

Embora as células da granulosa expressem pequenas quantidade de receptores (FSHR) para o hormônio folículo estimulante (FSH), a foliculogênese na fase pré-antral é independente do efeito de gonadotrofinas (BINELLI; MURPHY, 2010) e, assim, deve ser dirigida por estímulos parácrinos e autócrinos, ou outros fatores endócrinos. Um possível fator parácrino derivado do oócito que tem importante papel neste processo é o GDF9, pois ele estimula a proliferação das células da granulosa na progressão da foliculogênese (SU et al., 2009). Além disso, fatores produzidos pelas células da granulosa como folistatina (FST), inibina  $\beta$  (INHBB), entre outros, também estão envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular (BINELLI; MURPHY, 2010). A partir do momento em que as células da granulosa aumentam em número e novas camadas se formam, o folículo passa a ser classificado como secundário, caracterizado também pelo início da formação da zona pelúcida, uma camada de glicoproteínas que recobre o oócito e tem como uma de suas funções a proteção contra a poliespermia por ocasião da fecundação.

Na próxima fase da foliculogênese, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, devido à formação de um antro entre as várias camadas de células da granulosa. O fluido que compõe o antro é derivado do soro atraído pelo gradiente osmótico entre as células da teca e o folículo. A formação do antro coincide com a aquisição de sensibilidade por parte do folículo ao FSH, devido principalmente ao aumento na expressão de FSHR, fazendo com que as elevadas concentrações de hormônios esteroides presentes no antro passem a influenciar o desenvolvimento folicular (BINELLI; MURPHY, 2010). A formação do antro subdivide

as células da granulosa em duas populações com características e funções distintas: as células murais da granulosa (CMG) e as células do cumulus (CC). Enquanto as células murais da granulosa desempenham um papel central na síntese de hormônios e vários outros ligantes, as células do cumulus atuam dando suporte metabólico para o desenvolvimento do oócito (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2013). A diferenciação das células da granulosa nessas duas populações é principalmente influenciada por dois gradientes opostos de sinais morfogênicos, o FSH presente na corrente sanguínea e os fatores parácrinos derivados do oócito (SU et al., 2009; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2013).

Dentre os fatores-chave secretados pelo oócito responsáveis por regular o metabolismo das células do cumulus e, possivelmente, também o desenvolvimento folicular, estão o GDF9, o BMP15 e o Fator de Crescimento de Fibroblastos 8b (FGF8B) (SU et al., 2009). Esses e outros fatores secretados pelo oócito regulam a atividade metabólica nas células do cumulus promovendo a expressão de genes essenciais que se encontram inativos no oócito. Esses estímulos abrangem a expressão de receptores de aminoácidos e enzimas tanto da via glicolítica como da via de biossíntese de colesterol, pois oócitos não possuem a capacidade de metabolizar glicose a piruvato ou de sintetizar colesterol a partir de acetato. Deste modo, alguns aminoácidos como L-alanina têm de ser captados pelas CC e transferidos para os oócitos, assim como os produtos da via glicolítica e da via de biossíntese de colesterol, ambas realizadas pelas CC mediante a sinalização obtida (SU et al., 2009). Esses exemplos ilustram a cooperatividade metabólica entre oócito e células do cumulus, ressaltando a importância dessa cooperação para o desenvolvimento do gameta. Toda essa comunicação e troca de metabólitos é realizada através de junções do tipo GAP e aderente entre a membrana plasmática do oócito e das CG/CC. Em folículos primordiais já existem ligações dessa natureza entre o gameta e as pCG porém, após o início da fase de crescimento, o oócito começa a secretar a ZP, que acaba constituindo uma barreira a essa comunicação. Para transpor este obstáculo, as CG/CC emitem projeções citoplasmáticas que atravessam a ZP e, em suas extremidades, estabelecem contato com a membrana do oócito (CLARKE, 2018). Essa estrutura é denominada TZP (*Transzonal Projections*) e constitui filopódios especializados (EL-HAYEK et al., 2018). Estudo

recente realizado por EL-HAYEK et al. (2018) mostrou que o número de TZPs aumenta durante a fase de crescimento do oócito em resposta à secreção de GDF9, que estimula a transcrição de componentes estruturais de filopódios. Os autores ainda sugerem que GDF9, além de estimular a formação de novas TZPs, também funcione como um quimioatratante, controlando a orientação dessas estruturas.

A transição de folículo antral inicial para folículo pré-ovulatório resulta em um aumento de três a dez vezes no volume do folículo, assim como no remodelamento morfológico e bioquímico das células da teca e da granulosa. Esse enorme aumento do folículo é derivado, principalmente, da proliferação das células da granulosa e da expansão do antro. O oócito parece regular, em parte, o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório pela secreção de fatores como TGF- $\beta$ 1 e Activina A, além de fatores também importantes em fases anteriores como o GDF9, que também interagem com FSH e constituem um dos principais estímulos para o desenvolvimento folicular nesta fase (BINELLI; MURPHY, 2010). Como resultado, o folículo passa a sintetizar e secretar Estradiol e Inibina, além de as células da muralis da granulosa passarem a expressar receptores (LHR) para o Hormônio Luteinizante (LH). O Estradiol e a Inibina agem a nível da pituitária para gradualmente diminuir a secreção de FSH. Simultaneamente, o aumento da produção de Estradiol pelos folículos antrais induz a liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) e a consequente liberação de LH. Como resultado, há a progressão para a fase de folículo peri-ovulatório, a qual se caracteriza por expansão do folículo, bloqueio da proliferação das células da granulosa e expansão das CC, com perda da comunicação oócito-cumulus via TZPs.

O bloqueio meiótico exercido pelas CC é perdido por ocasião da expansão das mesmas, culminando numa série de eventos no oócito que constituem sua maturação nuclear e citoplasmática. A maturação nuclear é representada pela quebra da vesícula germinativa (GVBD), progressão da divisão meiótica até o estágio de metáfase II (MII) e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Já a maturação citoplasmática envolve a redistribuição de organelas como as mitocôndrias e os grânulos corticais. A expansão das células do cumulus também impede que essas continuem a suprir o oócito com fatores para os quais este é deficiente, como aminoácidos, piruvato e colesterol. Como consequência, aqueles oócitos que não acumularem esses e outros componentes durante o crescimento poderão ter sua

competência de desenvolvimento comprometida. Isso decorre, por exemplo, do fato de a maturação oocitária requerer um grande aporte energético, o qual, quando não suprido, pode resultar em defeitos severos (VAN BLERKOM, 2010). A redistribuição de organelas, a condensação da cromatina, a formação do fuso meiótico e a segregação cromossômica são processos que demandam muito ATP. Com a expansão das células do cumulus, o oócito deve utilizar suas próprias reservas para suprir a demanda energética desses processos, o que se não atendido pode resultar em comprometimento da fertilidade ou formação de embriões aneuplóides.

## **2.2. MITOCÔNDRIAS**

Mitocôndrias são organelas com dupla membrana que evoluíram de um processo endossimbiótico e desempenham atividades celulares importantes relacionadas à transdução de sinais e à ativação de apoptose (WATSON, 2004). Porém, acima de tudo, mitocôndrias produzem a molécula essencial para suprir as demandas energéticas da célula, o ATP. Tal produção se dá a partir do transporte de elétrons armazenados em equivalentes redutores (NADH, FADH, por exemplo) derivados da quebra de moléculas de ácidos graxos e de carboidratos, metabolizados por diversas vias metabólicas distintas (NELSON; COX, 2013). Esses elétrons são transportados ao longo dos quatro complexos pertencentes à cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana interna mitocondrial (NELSON; COX, 2013) e a passagem dos mesmos de um complexo para o outro resulta no transporte de prótons ( $H^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas da mitocôndria o que, ao final da cadeia, culmina na redução de uma molécula de  $O_2$  a  $H_2O$  (NELSON; COX, 2013). Caso a transferência de elétrons para  $O_2$  ocorra de forma incompleta, pode também haver geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VAN BLERKOM, 2010). O gradiente de ( $H^+$ ) gera um potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) que é utilizado pelo complexo V (ATP sintase) como força motriz para a síntese de ATP (NELSON; COX, 2013). Este processo, chamado de fosforilação oxidativa (OXPHOS), possibilita a produção de 18 vezes mais ATP do que seria obtido pela glicólise a partir de uma mesma quantidade de glicose (NELSON; COX, 2013). No entanto, a via glicolítica é extremamente importante pois seu produto direto é o piruvato, molécula que pode ser convertida pelo complexo da Piruvato Desidrogenase a Acetil-CoA, a qual é então importada pela mitocôndria para ser oxidada no Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) (NELSON; COX, 2013). Em conjunto,

esses processos geram os equivalentes redutores necessários para alimentar a cadeia transportadora de elétrons.

As mitocôndrias contêm seu próprio genoma (mtDNA), o qual em mamíferos possui formato circular e extensão de aproximadamente 16,5 mil pares de bases. O mtDNA encontra-se empacotado num complexo núcleo-protéico denominado nucleoide (KUKAT, 2013). Este complexo é organizado, principalmente, pelo fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), mas também estão presentes fatores como uma DNA polimerase mitocondrial (Polg), uma helicase (TWINKLE) e fatores que se ligam à fita simples de DNA (mtSSB) (KUKAT, 2013). O mtDNA codifica 13 polipeptídeos que integram, junto com polipeptídeos codificados pelo DNA nuclear (nDNA), quatro dos cinco complexos da cadeia transportadora de elétrons (WALLACE, 2005). Além desses, o mtDNA também codifica 22 RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossômicos (rRNAs), todos envolvidos na tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs) codificados pelo mtDNA (WALLACE, 2005). Cada célula nucleada de um organismo contém de centenas a milhares de moléculas de mtDNA, sendo que cada organela abriga várias dessas cópias, havendo normalmente uma associação entre a quantidade de mtDNA e capacidade oxidativa da mitocôndria. Isso ocorre porque a regulação do número de cópias de mtDNA está diretamente associada à sua capacidade de transcrição e de tradução, afetando diretamente, portanto, a função mitocondrial.

### **2.3. MITOCÔNDRIAS DURANTE O CRESCIMENTO DO OÓCITO**

Durante o crescimento do oócito, o número de mitocôndrias aumenta de menos de uma dezena em PGCs para cerca de cem mil em oócitos maduros (JANSEN; DE BOER, 1998). O aumento do número de moléculas de mtDNA durante o período também é muito grande, atingindo ~200.000 moléculas no oócito (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Esses achados sugerem que, diferentemente do que acontece em tecidos somáticos, o mtDNA seja mantido na linhagem germinativa feminina sob condição próxima da haploidia (e.g., uma ou duas moléculas por organela) (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). As mitocôndrias oocitárias também diferem enormemente das de outros tecidos no tocante à morfologia. Embora durante o crescimento do oócito as mitocôndrias sofram uma série de modificações morfológicas (MOTTA et al., 2000), essas organelas caracterizam-se pelo formato arredondado e pequeno tamanho. Essas características dão suporte a um estado de

baixa atividade oxidativa, o que minimiza a geração de ROS, mas não condiz com a demanda energética do oócito. Sabe-se que as células do cumulus suprem parte desta demanda (SU et al., 2009; COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2013), mas o ATP de origem glicolítica não é suficiente para o desenvolvimento do gameta. Neste sentido, o piruvato e outros subprodutos do metabolismo das células do cumulus são usados pelas mitocôndrias do oócito para complementar a sua demanda energética. Isso é possível, em parte, devido à proliferação em massa de mitocôndrias. Mas, sobretudo, a redistribuição mitocondrial é indispensável para que a demanda energética do oócito seja atendida (YU et al., 2010). Tal redistribuição e a formação de *clusters* possibilita que a necessidade por ATP seja suprida localmente numa porção do citoplasma, sem um aumento excessivo na atividade oxidativa, e com mínima formação de ROS (DUMOLLARD et al., 2003). Na ausência dessa redistribuição, tanto o crescimento do oócito como a sua maturação podem ser prejudicados, resultando em grave efeito sobre a fertilidade. Isso é comprovado em humanos, por exemplo, em que oócitos com baixo potencial de desenvolvimento apresentam distribuição mitocondrial aberrante e baixos níveis de ATP (VAN BLERKOM, 2010). Além disso, disfunções mitocondriais, com subsequente efeito sobre a produção de ATP, constitui o principal fator que compromete a qualidade do oócito, resultando em síndromes de infertilidade (VAN BLERKOM, 2010).

Outro fator de grande relevância para a fertilidade do oócito é o número de mitocôndrias e mtDNA. Isso decorre do fato que a expansão da população mitocondrial durante a oogênese é essencial para suprir não somente a demanda energética do gameta, como também do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento (JANSEN; DE BOER, 1998; DUMOLLARD; DUCHEN; SARDET, 2006). Com as clivagens embrionárias, as mitocôndrias do oócito são partilhadas entre as células filhas, resultando na diluição do número de mitocôndrias por blastômero à medida que o desenvolvimento progride. Uma vez que a mitocôndria e o mtDNA não são replicados durante o início do desenvolvimento, o oócito deve conter uma quantidade mínima desses (e.g., 40.000 cópias em murinos) para suportar o desenvolvimento do embrião. Em humanos, isso tem sido usado como uma ferramenta para a seleção de oócitos e embriões com maiores chances de desenvolvimento a termo. Além disso, a capacidade de oócitos inférteis de produzir

descendentes saudáveis após a suplementação com mitocôndrias ressalta o papel que essas organelas exercem na determinação da fertilidade.

## 2.4. DINÂMICA MITOCONDRIAL

Os processos de fusão e fissão trabalham em conjunto para manter a forma, o tamanho e o número apropriado de mitocôndrias na célula (BLEAZARD et al., 1999; SESAKI; JENSEN, 1999). Reduzida taxa de fusão leva a fragmentação mitocondrial devido a sucessivas divisões enquanto o bloqueio da fissão leva a uma rede de mitocôndrias altamente conectadas e tubulares (HOPPINS; LACKNER; NUNNARI, 2007). Esse controle de morfologia é crítico para a regulação da fisiologia da organela, assim como sua mobilidade e posicionamento na célula, garantindo o desempenho de suas funções.

Ambos os processos de fusão e fissão são controlados por proteínas altamente conservadas pertencentes à família das proteínas relacionadas à dinamina (DRPs). Tais proteínas possuem a capacidade de sequestrar e hidrolisar GTP (GTPase) com a finalidade de liberar energia para auxiliar no processo de modelagem de membranas mitocondriais (BLIEK, 1999; DANINO; HINSHAW, 2001; PRAEFCKE; MCMAHON, 2004; HOPPINS; LACKNER; NUNNARI, 2007). Proteínas desta família são encontradas em todos os reinos, e sua função em comum, até o momento, é a modelagem de membranas. Como revisado por FAELBER (2013), a ação de uma proteína típica da família em questão está relacionada à formação de hélices ancoradas em locais específicos da membrana para mediar o estrangulamento do citoplasma por ocasião da divisão celular. Da mesma forma, foi mostrado que a fissão mitocondrial é catalisada por uma DRP citosólica, conhecida como DMN1L ou DRP1, a qual é capaz de formar hélices cuja dimensão é compatível com o tamanho da mitocôndria (LABROUSSE et al., 1999; YOON; PITTS; MCNIVEN, 2001; INGERMAN et al., 2005).

Em mamíferos, GTPases relacionadas à dinamina também mediam a fusão da membrana externa, MFN1 e MFN2, e da membrana interna, OPA1 (CHEN et al., 2003). OPA1 é uma proteína localizada no espaço intermembranas da mitocôndria, associada à membrana interna (OLICHON et al., 2002; GRIPARIC et al., 2004), e como as Mitofusinas, OPA1 é essencial à fusão mitocondrial, pois o *knockout* da OPA1 por RNA de interferência (iRNA) leva a fragmentação mitocondrial, sinal de diminuição drástica da taxa de fusão (CIPOLAT et al., 2004; CHEN; CHOMYN;

CHAN, 2005). MFN1 e MFN2 são homólogos intimamente relacionados encontrados na membrana externa da mitocôndria (ROJO et al., 2002; CHEN et al., 2003). Essas duas proteínas possuem a capacidade de formar homo e heterodímeros, e são muito parecidas em termos estruturais e funcionais, apesar de desempenharem papéis em grande parte não redundantes (DETMER; CHAN, 2007).

As diferenças da função entre Mitofusinas são refletidas pelo fato de MFN1 ter maior afinidade por GTP quando comparado a MFN2 (ISHIHARA; EURA; MIHARA, 2004), e também pelo fato de MFN2 ser encontrado em outras organelas, como, por exemplo, no retículo endoplasmático (ER) (NAON; SCORRANO, 2014), enquanto o MFN1 foi descrito até o momento como presente somente em mitocôndrias (LABBÉ; MURLEY; NUNNARI, 2014). Há evidências de que o MFN1 seja responsável pelo ancoramento entre mitocôndrias que dá início à fusão e que MFN2 atue em etapas subsequentes do processo (CHEN et al., 2003). Tal suspeita foi reforçada pela descoberta de um eixo funcional entre MFN1 e OPA1 (CIPOLAT et al., 2004), que possibilita a ocorrência de um pequeno grau de fusão na ausência de MFN2, e justifica o grave efeito sobre a fusão mitocondrial na ausência de MFN1.

Há fortes evidências de que a MFN2 desempenha um papel na homeostase de  $Ca^{2+}$ , biossíntese lipídica, regulação metabólica, proliferação celular, autofagia, apoptose e diferenciação em vários tipos de células (NAON; SCORRANO, 2014; ZORZANO et al., 2015; SCHREPFER; SCORRANO, 2016). Neste contexto, a falta de MFN2 é comumente associada ao aumento da taxa de glicólise, aumento da proliferação celular e diminuição de autofagia/apoptose. Esses papéis de MFN2 são dependentes de regiões denominadas Membranas Associadas a Mitocôndrias (MAM), em que as mitocôndrias formam pontes interorganellares com o Retículo Endoplasmático (ER) (NAON; SCORRANO, 2014). MFN2 é enriquecido em MAM, onde se liga e inibe vários fatores, incluindo Ras e mTORC2, controlando diretamente processos importantes ao desenvolvimento celular como a síntese proteica (DE BRITO; SCORRANO, 2009; CHEN et al., 2014; XU et al., 2017). Como consequência, na ausência de MFN2, as vias de sinalização mTORC2/Akt e Ras/Raf1/ERK tornam-se altamente ativadas, sustentando o efeito inibitório de MFN2 na proliferação celular e na progressão do câncer (SCHREPFER; SCORRANO, 2016).



A importância da manutenção da dinâmica mitocondrial é revelada pela severidade das consequências de qualquer ruptura em alguns desses mecanismos. Por exemplo, camundongos deficientes em MFN1, MFN2 (CHEN et al., 2003), OPA1 (ALAVI et al., 2007; DAVIES et al., 2007) ou DRP1 (ISHIHARA et al., 2009; WAKABAYASHI et al., 2009) não sobrevivem até o nascimento; e mutações patogênicas no gene humano que codifica MFN2 leva à Síndrome Charcot-Marie-Tooth (ALEXANDER et al., 2000; WATERHAM et al., 2015).

## 2.5. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DAS MITOFUSINAS

Estudos baseados no nocaute ou na superexpressão de proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial proporcionam uma visão da função e da importância dessas proteínas e desses eventos para o bom funcionamento celular. Wakai *et al* (2014) determinaram que a superexpressão de MFN1 e MFN2 no oócito durante a maturação resultou em drástica agregação mitocondrial, com consequência para a distribuição espaço-temporal dos cromossomos e do ER. Já UDAGAWA et al. (2014) nocautearam a DRP1 exclusivamente nos oócitos durante a foliculogênese, o que resultou em alongação mitocondrial. Esse achado sugere que a fragmentação mitocondrial no oócito não é decorrente da ausência das GTPases de fusão MFN1, MFN2 ou OPA1, mas provavelmente devido a excessivos eventos de fissão em relação aos de fusão. Isso foi confirmado por WAKAI et al. (2014) que observaram MFN1, MFN2 e OPA1 são expressos em oócitos de camundongos. UDAGAWA et al. (2014) também observaram que o nocaute da DRP1 no oócito resulta em grave efeito sobre a fertilidade, ocasionado por um defeito no mecanismo de secreção de fatores parácrinos derivados do oócito, resultando na incapacidade do oócito em regular a foliculogênese. No entanto, apesar de tais oócitos apresentarem forte agregação mitocondrial, os efeitos sobre a fertilidade verificados neste modelo não podem ser atribuídos exclusivamente às mitocôndrias uma vez que a DRP1 é também envolvida em vários outros processos nas células (e.g., brotamento de vesículas secretórias).

Visando compreender o papel das mitofusinas nos oócitos, nosso grupo realizou *knockout* condicional (cKO) de MFN1 (*Mfn1* cKO), de MFN2 (*Mfn2* cKO) ou ambos (*Mfn1&2* cKO) em oócitos de camundongos por expressão de cre-recombinase dirigida pelo promotor Zp3 (dados não publicados). O acasalamento de fêmeas contendo oócitos *Mfn1* cKO com machos WT não resultou em nascimento.

Tal infertilidade associou-se à falha na ovulação (*Mfn1* cKO = 0 vs. WT =  $23,0 \pm 3,82$  oócitos/fêmea), acúmulo de folículos secundários (*Mfn1* cKO =  $251 \pm 36$  vs. WT =  $54 \pm 12$  folículos) e bloqueio da progressão meiótica quando do cultivo *in vitro*. Oócitos *Mfn1* cKO também apresentaram menor diâmetro (*Mfn1* cKO =  $57,8 \pm 0,73$  vs. WT =  $85,7 \pm 0,49$   $\mu\text{m}$ ) e menor nível de mtDNA (*Mfn1* cKO =  $39.263 \pm 2.878$  vs. WT =  $198.164 \pm 18.611$  cópias/oócito), ATP ( $0,03 \pm 0,016$  vs.  $0,46 \pm 0,076$  pmol/oócito) e  $\Delta\Psi\text{m}$  (*Mfn1* cKO =  $0,71 \pm 0,03$  vs. WT =  $1,00 \pm 0,03$  u.a.).

Os achados acima forneceram evidências de que a expressão de *Mfn1* é essencial para o crescimento e aquisição de competência por parte do oócito. Assim, este projeto dedicou-se a investigar mais a fundo o mecanismo molecular subjacente a este defeito.

## **HIPÓTESE E OBJETIVOS**

---

### 3. HIPÓTESE

O *knockout* condicional de *Mfn1* no oócito altera o balanço entre a quantidade de MFN1 e MFN2 necessário ao desenvolvimento do gameta, resultando em defeito na comunicação oócito-granulosa, com conseqüente bloqueio do desenvolvimento folicular e incapacidade de crescimento do oócito.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. GERAL

- Investigar os mecanismos moleculares envolvidos com a infertilidade de fêmeas murinas cKO para *Mfn1* no oócito.

#### 4.2. ESPECÍFICOS

##### **Baseado no cKO de *Mfn1*:**

- Analisar a ultraestrutura de ovários contendo oócitos *Mfn1* cKO e WT por microscopia eletrônica de transmissão;

- Avaliar, em ovários contendo oócitos *Mfn1* cKO e WT, as taxas de proliferação e de apoptose por imunofluorescência;

- Avaliar por PCR quantitativo (qPCR) a expressão em oócitos *Mfn1* cKO e WT de genes envolvidos com i) a dinâmica mitocondrial (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1* e *Dnm1l*); ii) a atividade mitocondrial (*Nrf1*, *Tfam*, *Sdha* e *Mt-CO1*, *Atp5a1*); iii) a comunicação oócito-granulosa (*Bmp15*, *Fgf8b* e *Gdf9*); iv) a via da Akt (*Akt*, *Pi3k*, *Pten*, *Pdk1*) e metabolismo glicolítico (*Ldha*, *Pfkp*, *Pkm2*);

- Avaliar, em ovários contendo oócitos *Mfn1* cKO e WT, a expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento folicular (*Fshr*, *Lhcgr*, *Inha*, *Inhba*, *Inhbb*, *Amh*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Fgf7*, *Fst*, *Kit*, *Kitl*, *Kitl1*, *Kitl2*, *Cyp26b1*);

- Cultivar complexos oócito-células da granulosa (GOCs) contendo oócitos *Mfn1* cKO na presença de oócitos WT ou de oócitos *Mfn1* cKO para avaliação da expressão nos GOCs de genes relacionados ao desenvolvimento folicular (*Fshr*, *Lhcgr*, *Inha*, *Inhba*, *Inhbb*, *Amh*, *Fst*, *Kitl* e *Cyp26b1*);

##### **Baseado na superexpressão de MFN2 e de MFN1+MFN2 durante a etapa de crescimento do oócito:**

- Superexpressar MFN2 para confirmar se o excesso de MFN2 em relação a MFN1 é a causa principal da interrupção do desenvolvimento de oócito *Mfn1* cKO

avaliando diâmetro dos oócitos, taxa SN/NSN e as quantidades de pAkt/Akt e pmTOR;

- Superexpressar MFN1+MFN2 para verificar se a expressão balanceada de Mitofusinas permite o desenvolvimento do oócito também avaliando diâmetro dos oócitos, taxa Surrounding Nucleolus/Not Surrounding Nucleolus e as quantidades de pAkt/Akt e pmTOR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. ANIMAIS

Os camundongos utilizados neste trabalho são pertencentes à linhagem B6 e foram mantidos seguindo-se os procedimentos já em uso na instituição, como previamente aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e pela Comissão de Ética (CEUA) da UFSCar. Para realização dos experimentos foram utilizadas fêmeas de 5 ou 8 semanas de idade, mantidas em ciclo de 14 h de luz e 10 de escuro a temperatura de 25°C com acesso *ad libitum* a água e a ração (Presence Ratos e Camundongos, Purina).

### 5.2. GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS

A genotipagem dos animais foi realizada a partir do DNA total isolado de biópsia de orelha, como descrito previamente (MACHADO et al., 2015). Resumidamente, as biópsias de orelha foram incubadas com 200 µL de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/mL gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/mL proteinase K] por 3 h a 65°C. Ao final, as amostras foram incubadas por 10 min adicionais a 95°C para inativação da proteinase K e armazenadas a -20°C até o uso. A genotipagem das modificações no gene *Mfn1* foi realizada como descrito por Chen *et al* (2010) e o transgene Zp3-Cre analisado como descrito por de Vries *et al* (2000). Em mais detalhes, a verificação da presença de sequências LoxP flanqueando o éxon 4 do gene *Mfn1* foi realizada por PCR utilizando-se os primers F: TTGGTAATCTTTAGCGGTGCTC e R: AGCAGTTGGTTGTGTGACCA. Também foi avaliada a presença de alelos previamente excisados, agora se utilizando o seguinte par de primers: F: TTGGTAATCTTTAGCGGTGCTC e R: TTAAAGACACGGCTAATGGCAG. Estes ensaios foram realizados a partir de uma diluição contendo 40 µl de água e 10 µl da amostra digerida e do Mix JumpStart (Sigma) com concentração final de primer igual a 0,4 M e temperatura de anelamento igual a 65°C. Para verificação da presença do transgene Zp3-Cre, foram realizados ensaios de PCR em tempo real utilizando-se uma diluição contendo 49,5 µl de água e 0,5 µl da amostra digerida com Master Mix Syber Green (Thermo Fisher Scientific), temperatura de anelamento 62°C e primers F: GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC e R: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT, no equipamento ABI PRISM SDS 7500 HT Real-Time PCR System (Life Technologies).

### 5.3. COLETA DE OÓCITOS E OVÁRIOS

Para o isolamento de oócitos, o desenvolvimento folicular foi estimulado por injeção peritoneal de 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) em fêmeas com 5 semanas de idade (NAGY et al., 2003). Após 44 a 46 h, as fêmeas foram sacrificadas e os ovários dissecados em solução fisiológica. Os ovários foram então transferidos para gotas de meio FHM (NAGY et al., 2003) e os complexos oócito-cumulus (COCs) obtidos por rompimento dos folículos antrais com o auxílio de uma agulha 30G (NAGY et al., 2003). Os oócitos foram desnudados das células do cumulus por pipetagem com auxílio de um capilar de vidro de diâmetro interno próximo ao dos oócitos (NAGY et al., 2003). Somente oócitos íntegros, sem células do cumulus e em estágio de vesícula germinativa (GV) foram selecionados para uso nos experimentos posteriores. Os ovários para microscopia foram coletados como descrito acima, assim como aqueles destinados às análises histológicas, exceto pelo fato de que essas fêmeas não foram estimuladas com eCG e tinham 8 semanas de idade.

### 5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os ovários utilizados para microscopia eletrônica de transmissão foram dissecados, cortados em pedaços menores e fixados em tampão cacodilato 0,1 M contendo 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído por 4h a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, os fragmentos de ovário foram lavados em gotas de solução 1:1 de tampão cacodilato 0,1M e água MilliQ três vezes. Os fragmentos foram então emblocados em resina epóxi, cortados em seções ultra-finas e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Para análise foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão pertencente à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

### 5.5. IMUNOFLORESCÊNCIA DE CORTES DE OVÁRIO

Fêmeas contendo oócitos WT ou *Mfn1* cKO foram injetadas intra-peritonealmente com 3 mg de BrdU (UDAGAWA et al., 2014). Passadas duas horas, as fêmeas foram sacrificadas e os ovários coletados, dissecados e fixados por 4 h em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) diluído em PBS. Os ovários foram então tratados com gradiente de sacarose 10-20% e criopreservados em OCT (Sakura Finetek). Com auxílio de um micrótopo (Leica), seções de 5 µm do órgão foram



obtidas e fixadas em lâmina previamente gelatinizada (6%), que foram mantidas a -20°C até uso (UDAGAWA et al., 2014).

Para análise por imunofluorescência, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em PBS por, no mínimo, 4 horas e foram então fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 2% (Sigma-Aldrich) em PBS. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de recuperação antigênica, que consiste na incubação, por 20 minutos, em solução de citrato de sódio 10mM e Tween 20 0,05% a 95°C. Passado este período esperou-se que as lâminas, ainda imersas na solução, voltassem à temperatura ambiente e procedeu-se ao bloqueio com BSA 10% (Sigma-Aldrich) em PBS. Após bloqueio os cortes foram incubados *overnight* com o anticorpo primário (anti-BrdU, produzidos em camundongo; Sigma-Aldrich) diluído 1:50 em solução BSA 2%. No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com solução de BSA 2% contendo o anticorpo secundário (Alexa Fluor 594 – Thermo Fisher Scientific) e DAPI (10 µg/ml). Finalmente, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes cobertos com lamínula contendo meio de montagem (Fluormont, Sigma) para serem analisadas em microscópio epifluorescente (Ti-S, Nikon).

As imagens foram analisadas com auxílio do software fornecido pelo fabricante. Durante a análise, foram obtidas fotos em campo claro, com filtro UV e com filtro verde, para visualização da marcação com o anticorpo secundário. A área de cada folículo foi determinada e delimitada, de forma a viabilizar a contagem do número total de células (pela marcação com DAPI) e o número de células positivas para a marcação com anticorpo anti BrdU. Deste modo, o dado final obtido foi a porcentagem de células positivas para replicação, a partir da divisão de células BrdU + pelo número total de células contadas na secção do folículo em questão.

## **5.6. EXPRESSÃO GÊNICA**

Grupos de 30 oócitos imaturos e desnudos foram coletados em 5 µL de PBS acrescido de 0,1% de PVP e 1 U/µL de inibidor de RNase (RNase OUT, ThermoFisher Scientific), congelados em nitrogênio líquido e mantidos até uso a -80°C. Já os ovários foram coletados individualmente, congelados em nitrogênio líquido e também mantidos a -80°C. A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, um *mix* contendo 100 µL do reagente TRIzol, 5 µL de H<sub>2</sub>O DEPC e 1,33 µL de GlycoBlue™ 15 mg/mL (ThermoFisher Scientific) foi

adicionado ao grupo de oócitos. Então adicionou-se 20 µL de clorofórmio à solução com a finalidade de separar a fase aquosa da orgânica, prosseguindo-se a uma centrifugação de 15 min a 12.000 x g a 4°C. Em seguida, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado por adição de 150 µL de álcool isopropílico seguido de centrifugação a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. O pellet de RNA foi então lavado com 100 µL de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g durante 5 min a 4°C. O etanol 75% foi removido e o pellet eluído em 5µL de H<sub>2</sub>O DEPC. O RNA total extraído foi tratado com 5 µL de solução de DNase I (ThermoFisher Scientific) mais 1 U/µL de RNaseOUT para a degradação de DNA contaminante, conforme recomendações do fabricante. Imediatamente após o tratamento com DNase I, o RNA foi convertido em cDNA utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies), e armazenado a -80°C até o uso. Para extração de RNA total de ovários, o tecido foi macerado em nitrogênio líquido e a extração realizada como descrito acima com ajuste (x10) nos volumes utilizados devido à maior quantidade de material biológico inicial.

Para validação dos primers desenhados, foi realizado um ensaio inicial com diluição seriada de amostra para verificar se os primers se comportavam da mesma maneira independentemente da concentração de cDNA presente e também para auxiliar na escolha da melhor diluição a ser utilizada na análise. Para as análises realizadas a partir de oócitos, foram testadas as seguintes concentrações:

P1: 0,25 oócito/µL;

P2: 0,0625 oócito/µL;

P3: 0,0156 oócito/µL;

P4: 0,0039 oócito/µL;

De forma que as análises do nível de expressão dos genes (*Dnm1l*, *Fgf8b*, *Gabpa*, *Mfn2*, *Opa1*, *Tfam*) foram realizadas com cDNA diluídos no P2 e a análise dos genes (*Akt*, *Bmp15*, *Gdf9*, *Mfn1*, *Mtco1*, *Nrf1*, *Sdha*, *Pten*, *Pi3k*) foram realizadas com cDNA diluído no P3.

Para os genes analisados no ovário, os pontos testados foram os seguintes:

P1: Diluição de 80x;

P2: Diluição de 320x;

P3: Diluição de 1.280x;

P4: Diluição de 5.120x;

Todas as análises baseadas em cDNA de ovário foram realizadas na diluição P2, com exceção do gene *Cyp26b1*, que foi realizada na diluição P1.

A quantificação relativa dos transcritos por qPCR foi realizada no equipamento ABI PRISM SDS 7500 HT Real-Time PCR System (Life Technologies) em reações de 15 µL contendo 0,3 µM de *primers*, 1x SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) e 5 µL de cDNA na diluição específica definida anteriormente. Foram realizadas curvas de diluição com diferentes concentrações de cDNA para padronização dos primers. Além disso, essas curvas foram utilizadas como padrão para definição da melhor concentração de cDNA para a realização da análise.

Os primers foram desenhados utilizando-se a ferramenta online Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e, quando possível, os primers foram desenhados para anelar sobre junções exon-exon, evitando assim a amplificação de possível DNA genômico contaminante. Os dados foram analisados seguindo-se o que foi proposto por MACABELLI et al. (2014). A tabela 1 traz um resumo dos genes analisados e dos primers utilizados para tal.

**Tabela 1:** Genes analisados por qPCR em ovário e oócitos imaturos

Gene alvo	Sequência primer (5'→3')	Gene alvo	Sequência primer (5'→3')
<i>Amh</i> *	F: CTGGCTAGGGGAGACTGGAG R: TCGGGCTCCCATATCACTTC	<i>Cyp26b1</i> *	F: AGATCCTACTGGGCGAACAC R: GGAGAAGACCTTGCGCTTGT
<i>Bmp4</i> *	F: GAGGGATCTTTACCGCTCC R: TGTTCTCCAGATGTTCTTCGTGA	<i>Mfn1</i> ***	F: CTGCTTCTGAGTGTGCGAGG R: ATGCACAAGACAGCCAGCTT
<i>Bmp7</i> **	F: ATCGTCCAGACACTGGTTCAC R: GAGGACAGAGATGGCGTTGA	<i>Mfn2</i> ***	F: CATGAGGCCTTCTCCTCAC R: CAACTGCTCGTCTGATGGA
<i>Fgf7</i> *	F: GAGAGGCTCAAGTTGCACGA R: GGTTGCTCCTGACTTTTGTCT	<i>Opa1</i> ***	F: ATTGTCGGAGCAGGAATCGG R: AGGATTGGCAGACTTCACAGG
<i>Fshr</i> *	F: GGAGGGCCAGGTCAACATACC R: GAAGTCAGAGGTTTGCCGC	<i>Dnm1l</i> ***	F: TAGATCCAGATGGGCGCAGA R: GCATCAGTACCCGCATCCAT
<i>Fst</i> *	F: GAGGACAGAGATGGCGTTGA R: CCACGTTCTCACAGTTTCTTT	<i>Mt-Co1</i> ***	F: TCGCAATTCCTACCGGTGTC R: CTCCGTGTAGGGTTGCAAGT
<i>Inha</i> *	F: TATTCCGGCCATCCAACAC R: CAGAAGATCTAGCAGGGGCG	<i>Sdha</i> ***	F: TCGACAGGGGAATGGTTTGG R: GGACTCCTCCGAGCTTCTG
<i>Inhba</i> *	F: GGGACCCGAAAGAGAATTTGC R: TCCTCTCAGCCAAAGCAAGG	<i>Tfam</i> ***	F: GAGCGTGCTAAAAGCACTGG R: GACAAGACTGATAGACGAGGGG
<i>Inhbb</i> *	F: TTTGCAGAGACAGATGGCCT R: GAAGAAGTACAGGCGGACCC	<i>Bmp15</i> ***	F: AAGGGAGAACCGCACGATTG R: TGTACATGCCAGGAACCTCTG

<i>Kit*</i>	F: ACAACAAAGAGCAAATCCAGGC R: GCTGCAACCACAAAGCCAAT	<i>Gdf9***</i>	F: CAACCAGGTGACAGGACCG R: CACCCGGTCCAGGTAAACA
<i>Kitl*</i>	F: TGCTGGTGCAATATGCTGGA R: GTGATAATCCAAGTTGTGTCTTCT	<i>Fgf8b***</i>	F: GCTAATTGCCAAGAGCAACGG R: AGCGCCGTGTAGTTGTTCTC
<i>Kitl1*</i>	F: TTCAACATTAGGTCCCGAGAA R: TCGGGCTTTCCTATTACTGC	<i>Nrf1***</i>	F: AGGCGGTGAAATGACCATC R: GCGGCAGCTTCACTGTTGAG
<i>Kitl2*</i>	F: TAGGTCCCAGAAAAGGGAAA R: CGAAATGAGAGCCGGCAATG	<i>Atp5a1***</i>	F: CCTTGACCTTCTTTGCGCT R: ATTTTTGGAGACCAGTCCCGC
<i>Lhcgr*</i>	F: CTCGCCGACTATCTCTCAC R: TTGAGGAGGTTGTCAAAGGCA	<i>Ldha***</i>	F: TCTCCAGCAAGACTACTGTGT R: GTTTCGCTGGACCAGGTTGA
<i>Akt**</i>	F: AAGAAGGAGGTCATCGTCGC R: CTTGAGGGCCGTAAGGAAGG	<i>Pfkp***</i>	F: TGGTACAGATTCAGCCCTGC R: ACCAAGGCCAAGTAACCACA
<i>Pten**</i>	F: TTCCTGCAGAAAGACTTGAAGGT R: AAAGGATACTGTGCAACTCTGC	<i>Pkm2***</i>	F: CATTACCAGCGACCCACAG R: GAGCACTCTGCCAGACTTG
<i>Pi3k**</i>	F: ATGCCTGCTCCGTAGTGGA R: CACGAGGGAGGTGTGTTGAT	<i>Pdk1***</i>	F: TGCAAAGTTGGTATATCAAAGCC R: ACCCCGAAGCTCTCCTTGTA

\* Indica transcritos que foram analisados apenas em ovários  
\*\* Indica transcritos que foram analisados em ovário e em oócitos imaturos  
\*\*\* Indica transcritos que foram analisados apenas em oócitos imaturos

## 5.7. CO-CULTIVO

Para realização do co-cultivo, oócitos WT e *Mfn1* cKO foram obtidos como descrito anteriormente. GOCs contendo oócitos *Mfn1* cKO foram coletados após digestão dos ovários por 15 min a 37°C com 0,1% de colagenase (tipo I; Sigma-Aldrich) diluída em FHM. Ao menos três grupos de GOCs *Mfn1* cKO e oócitos WT foram cultivados em uma placa por 24 h em gotas de 90 µl de FHM, suplementado com 100 µM de IBMX (UDAGAWA et al., 2014; ZENG et al., 2014) e ao menos outros três grupos de GOCs *Mfn1* cKO foram cultivados com oócitos *Mfn1* cKO nas mesmas condições, como grupo controle. Após as 24 horas de cultivo, os GOCs foram coletados para análise de expressão gênica.

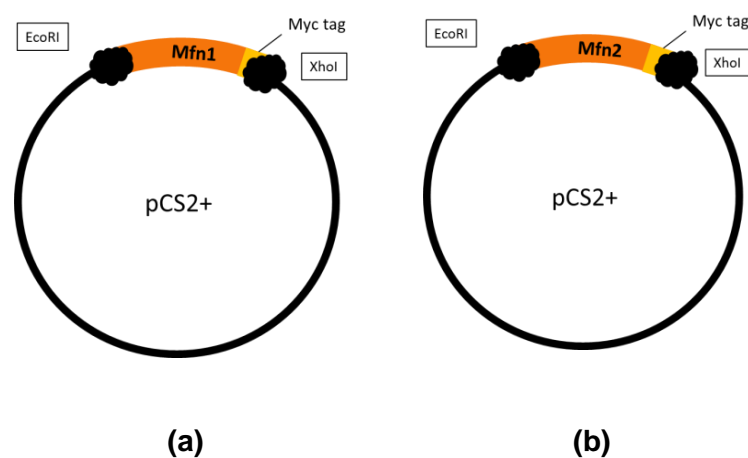
## 5.8. PLASMÍDEOS PARA SUPEREXPRESSÃO

As regiões codificantes de MFN1 e MFN2 de camundongo foram amplificadas por PCR (Taq Polymerase High Fidelity, Invitrogen) a partir de plasmídeos comerciais (tabela 2). Os produtos *Mfn1* e *Mfn2* incluindo a cauda Myc ao final da sequência foram clonados em vetor pCS2<sup>+</sup> (Invitrogen) entre os sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI* (figura 1 a, b). O tamanho dos fragmentos clonados foi confirmado por

eletroforese em gel de agarose e a sequência final dos plasmídeos verificada por sequenciamento de Sanger (Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Canada).

**Tabela 2:** Primers utilizados na construção dos plasmídeos para superexpressão

Produto	Primers (5'→3')	Template
<i>Mfn1_Myc</i>	F: ATACTGAATTCATGGCAGAAACGGTATCTCC R: TATGACTCGAGTCAATGATGATGATGATGAT	Addgene #23212
<i>Mfn2_Myc</i>	F: ATACTGAATTCATGTCCCTGCTCTTTTCTCG R: TATGACTCGAGTCAATGATGATGATGATGAT	Addgene #23213



**Figura 1:** Plasmídeos construídos para realizar a superexpressão de MFN1 (a) e MFN2 (b).

Os plasmídeos contendo as regiões codificadoras para *Mfn1* e *Mfn2* fusionadas com a cauda *Myc* foram então linearizados utilizando-se *NodI*, e cRNA foi transcrito tendo o plasmídeo linearizado como template utilizando-se o kit SP6 mMESSAGE mMACHINE (Ambion). Uma cauda poli(A) foi adicionada ao cRNA obtido utilizando-se o Tailing Kit (Ambion). Os cRNAs obtidos ao final do processo foram eluídos em água livre de RNase e mantidos a -80°C até uso.

## 5.9. COLETA, MICROINJEÇÃO DE cRNA E CULTIVO DE GOCS

Os GOCs foram obtidos e cultivados como descrito anteriormente (EL-HAYEK; DEMEESTERE; CLARKE, 2014; EL-HAYEK; CLARKE, 2015). Resumidamente, ovários de fêmeas com 12 dias de idade foram incubados em meio  $\alpha$ -MEM-HEPES (pH 7.2, Life Technologies) contendo colagenase (10  $\mu$ g/mL; Cedarlane, Burlington, ON) e DNase I (10  $\mu$ g/ml; Sigma) a 37°C por 15 minutos. Em intervalos de 2 ou 3 minutos os fragmentos foram gentilmente pipetados para auxiliar

no processo de digestão. Ao final do período de incubação, GOCs foram coletados com auxílio de uma pipeta de vidro e transferidos para meio meio  $\alpha$ -MEM-HEPES fresco e aquecido.

Utilizando-se um microscópio Zeiss Axio Observer Z1 e um microinjetor PLI-100 (Medical Systems, NY), aproximadamente 10  $\mu$ L de uma solução contendo cRNA a uma concentração de 100  $\mu$ M foi injetada no citoplasma do oócito pertencente ao GOC (tabela 3) e o GOC foi então transferido para insertos recobertos por colágeno tipo I (3.0  $\mu$ m, Becton-20 Dickinson, Mississauga, ON) previamente posicionados em uma placa de 24 poços, cada poço contendo 750  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM-NaHCO<sub>3</sub> suplementado com ITS (Sigma), cilostamida (10  $\mu$ M, Sigma) e FSH (10 mIU/mL; EMD Serono, Mississauga, ON). Os GOCs foram cultivados por um período de 7 dias em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 3 dias o inserto foi movido para um novo poço contendo 750  $\mu$ L meio fresco.

**Tabela 3:** Descrição dos grupos experimentais

cRNA injetado	Grupo experimental
EGFP	Controle
MFN2	MFN2 OE
MFN1+MFN2	MFN1+MFN2 OE

## 5.10. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE OÓCITOS

Após o período de cultivo, os GOCs foram coletados, os oócitos desnudos e coletados para análise por western blot ou imunofluorescência. Os oócitos coletados para imunofluorescência foram fixados a temperatura ambiente por 30 minutos em paraformaldeído 4% em PBS contendo Triton-X (0.1%, Sigma), e então lavados em Tampão de Bloqueio (TB) – PBS contendo BSA (3%, Sigma) and Triton-X (0,1%, Sigma). A seguir as células foram bloqueadas com TB por outros 30 minutos e incubadas *overnight* com anticorpo primário contra MFN1 ou MFN2 (Abcam ab57602 e ab56889, respectivamente) diluídos 1:100 em TB. Após este período, os oócitos foram lavados duas vezes em PBS e então incubados por uma hora a temperatura ambiente em solução de anticorpo secundário (1:100) suplementado com DRAQ5 (1:20). Os oócitos foram então lavados e posicionados em gotas de PBS cobertas com óleo mineral e imagens foram adquiridas utilizando-se um microscópio invertido (Leica). Para medir o diâmetro do oócito imagens foram obtidas com foco no

diâmetro máximo dos oócitos e as medidas realizadas com auxílio do software fornecido pelo fabricante (LAS X, Leica).

### **5.11. WESTERN BLOT**

Grupos de 30 ócitos desnudos foram transferidos para um microtubo contendo 10  $\mu$ L de Tampão Laemmli 2x (Biorad) e desnaturados por aquecimento a 95°C por 5 minutos. Essas amostras foram então utilizadas para análise de western blot como descrito previamente (YANG et al., 2010). Os anticorpos são contra MFN1 (Abcam, ab57602), MFN2 (Abcam, ab56889), pmTOR (Cell Signalling, #2971s) e Actina (Cell Signalling, #3700). As membranas foram reveladas utilizando-se (SuperSignal™ West Pico PLUS, Thermo Scientific) e phosphorimager (Amersham Imager). A intensidade das bandas foi quantificada utilizando-se o software ImageJ (National Institutes of Health).

### **5.12. ANÁLISE DOS DADOS**

Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes cada e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS University Edition (SAS/STAT, SAS Institute Inc.) com nível máximo de significância igual a 5% (erro  $\alpha$ ). Previamente a cada análise, foi verificado se os dados seguem as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Se a premissa foi atendida, os grupos experimentais foram comparados por *t*-Student ou por aplicação do método ANOVA. Do contrário, os dados foram analisados por teste não paramétrico. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  o erro padrão da média (SEM).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



**PARTE 1:***KNOCKOUT* CONDICIONAL DA MITOFUSINA 1

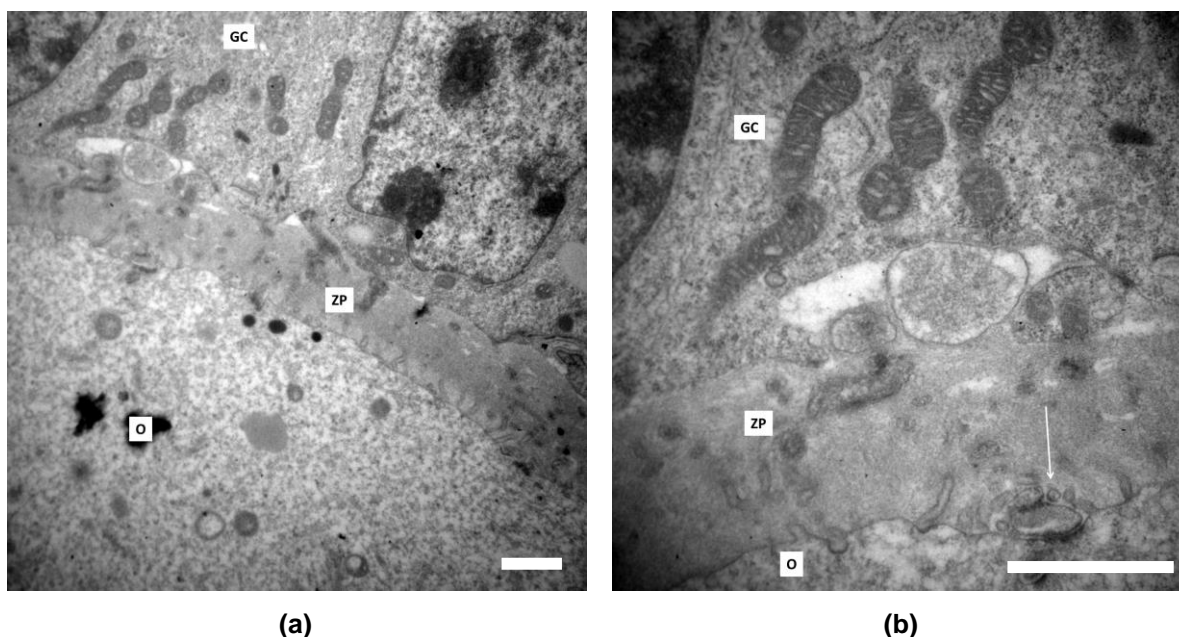
---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. PARTE 1: KNOCKOUT CONDICIONAL DA MFN1

#### 6.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão

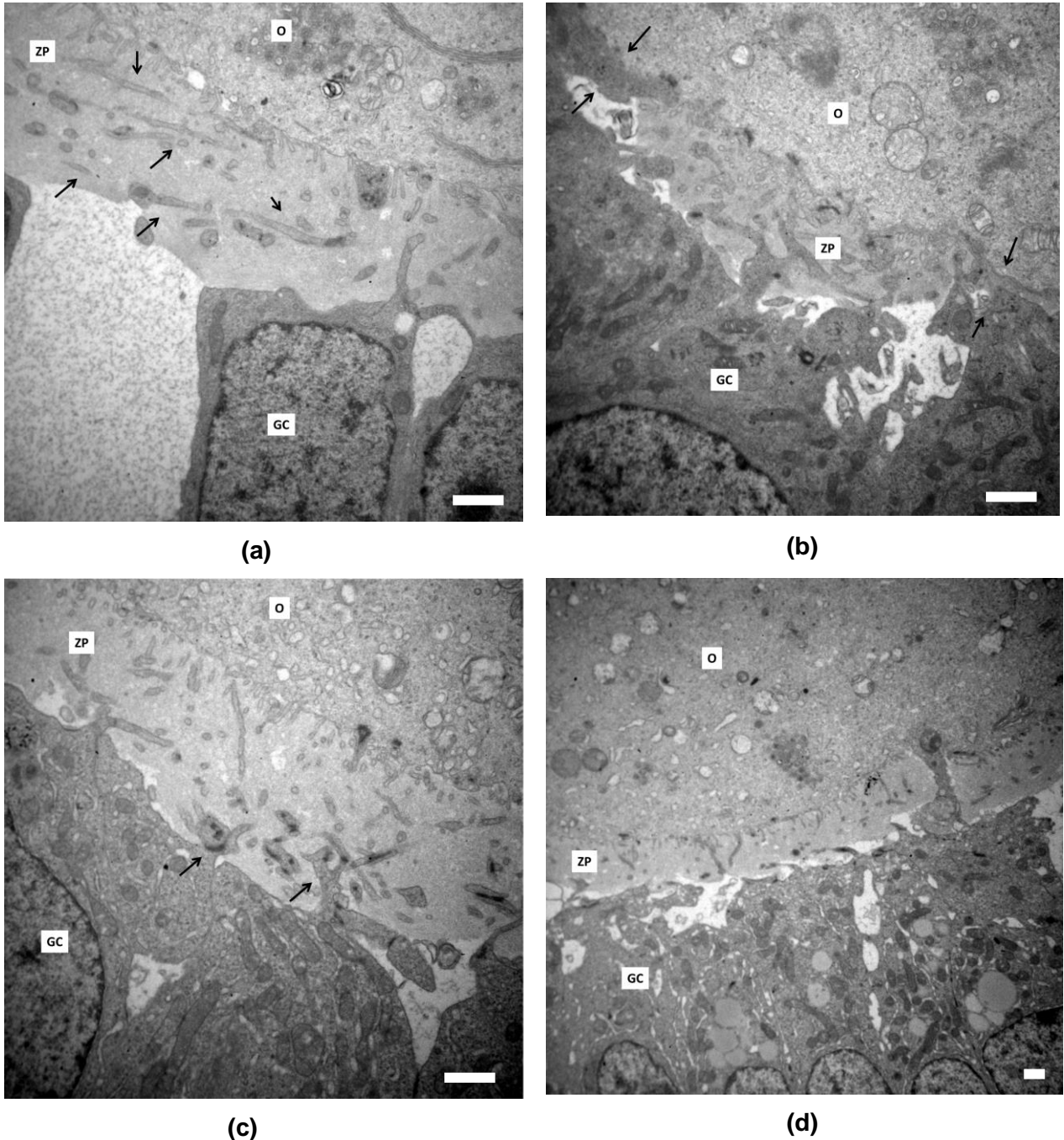
As fotos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão permitiram analisar a ultraestrutura dos ovários coletados, pois foram avaliados a distribuição das células da granulosa, a estrutura da zona pelúcida e o citoplasma do oócito, incluindo as organelas e sua morfologia. Os ovários WT apresentaram, em geral, células da granulosa bem distribuídas e justapostas, com mitocôndrias alongadas de alta densidade de cristas, além de zona pelúcida espessa com várias projeções transzonais das células da granulosa (TZPs) em direção ao oócito (figura 2a). Também foi possível identificar os pontos em que as TZPs atingem a membrana plasmática do oócito e estabelecem junções do tipo aderente (figura 2b).



**Figura 2:** Microscopia eletrônica de ovários WT. (a) Região contendo parte da *corona radiata* (CG), zona pelúcida (ZP) e citoplasma do oócito (O) de um ovário WT. (b) Região de maior aumento da ZP, evidenciando morfologia das mitocôndrias da CG. A seta indica extremidade de uma TZP estabelecendo junção do tipo aderente com a membrana plasmática do oócito. Barras = 1µm.

Em comparação, os ovários *Mfn1* cKO apresentaram divergências na ultraestrutura, como espaços entre as células da granulosa (figura 3a), zona pelúcida mais fina ou ausente em alguns pontos (figura 3b), e constante aparecimento de TZPs com orientação paralela à membrana plasmática do oócito (figura 3a, setas). Além disso, foi comum o aparecimento de estruturas consideradas

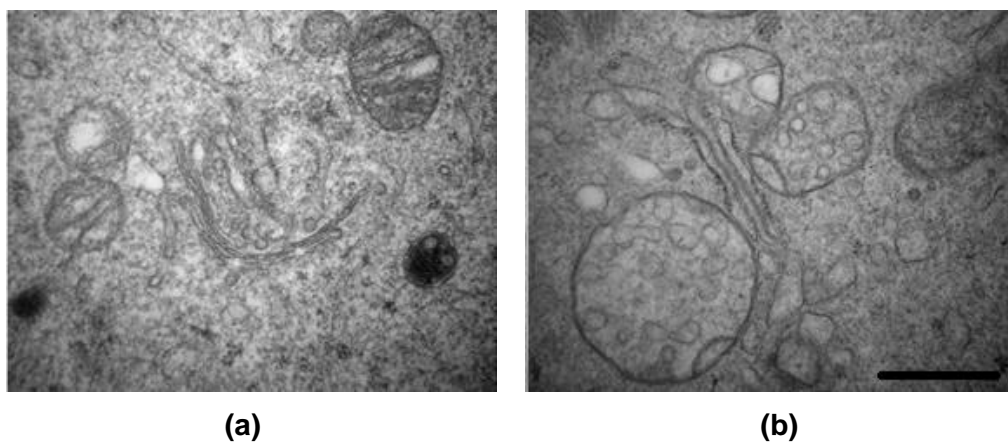
anormais, como invasão da zona pelúcida por projeções das células da granulosa mais espessas que TZP normais, como indicado nas figuras 3c e 3d. Analisando essas e outras micrografias, fica evidente o impacto do cKO no fenótipo dos ovários *Mfn1* cKO.



**Figura 3:** Micrografias ilustrando a ultraestrutura anormal de ovários do grupo *Mfn1* cKO, contendo evidências de (a) espaçamento entre as células da granulosa e (setas) as TZPs paralelas à membrana plasmática do oócito, (b) regiões com ZP mais fina (setas), (c) e (d) invasões da zona pelúcida por projeções anormalmente grossas das células da granulosa (setas).

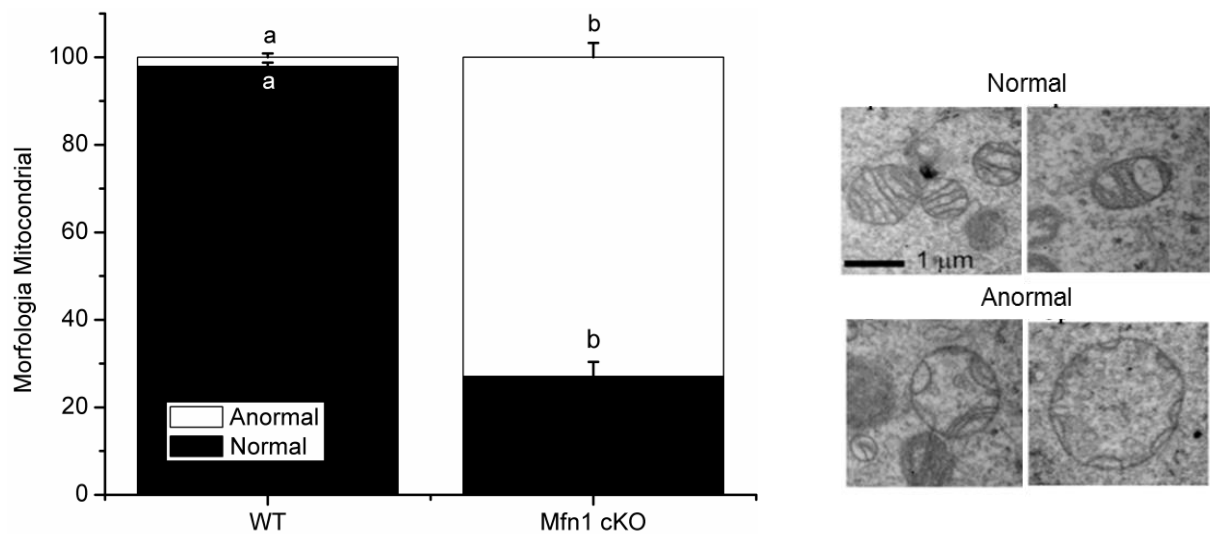
O espaçamento notado entre as células da granulosa do grupo *Mfn1* cKO poderia ser artefato da preparação do ovário. No entanto, esse padrão foi observado em todos os animais analisados para este grupo e não estava presente em nenhuma grade do WT; mas uma afirmação nesse sentido só pode ser feita mediante análise específica, como imunofluorescência para proteínas de adesão celular ou western blot, por exemplo. Já as regiões em que se observou zona pelúcida com menor espessura, conforme ilustrado na figura 3b, podem ser evidências de atraso na secreção de proteínas ou mesmo de uma falha nesse processo. Isso porque os animais foram estimulados com eCG, então, era esperado que o desenvolvimento folicular estivesse sincronizado.

Além do fenótipo associado às TZPs e à zona pelúcida, foi possível notar mudanças na morfologia das mitocôndrias (Figura 4). O grupo WT apresentou mitocôndrias arredondadas com alta densidade de cristas. Já no grupo *Mfn1* cKO, as mitocôndrias raramente apresentavam cristas, mas sim uma estrutura interna desorganizada e vesicular.



**Figura 4:** Micrografias ilustrando morfologia de mitocôndrias pertencentes a oócitos WT (a) e a oócitos *Mfn1* cKO (b).

Foram definidos, então, padrões normais de morfologia mitocondrial (que enquadram mitocôndrias com cristas longitudinais, podendo estar espaçadas ou não) e padrões anormais de morfologia mitocondrial (que incluem organelas com cristas menos densas e não longitudinais, podendo apresentar estrutura interna altamente vesiculada). E tais padrões foram utilizados para classificação das organelas encontradas para cada um dos grupos experimentais, conforme ilustrado na figura 5.

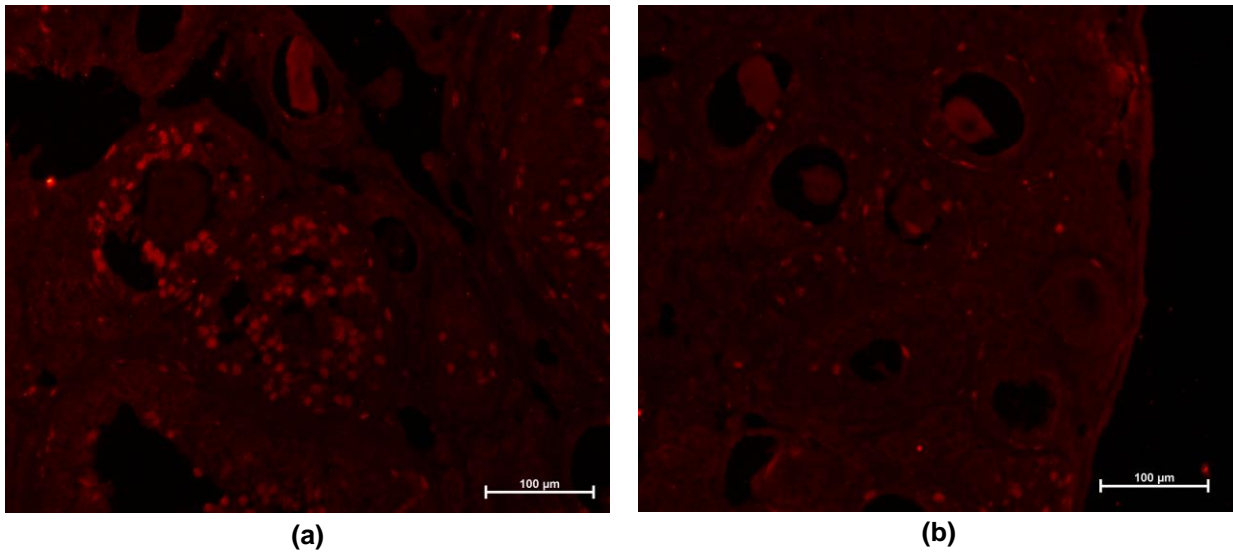


**Figura 5:** Análise quantitativa da distribuição de mitocôndrias com morfologia considerada normal ou anormal entre os grupos experimentais. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa com  $P < 0,05$ .

É possível atribuir o forte efeito na morfologia mitocondrial diretamente à ausência de MFN1, pois apenas MFN1 possui a capacidade de recrutar OPA1 e dar início à segunda etapa da fusão mitocondrial, a fusão da membrana interna que delimita a matriz mitocondrial (CIPOLAT et al., 2004). Deste modo, nos oócitos *Mfn1* cKO, apenas a fusão da membrana externa ocorre normalmente, ao passo que as matrizes mitocondriais, delimitadas pelas membranas internas de cada organela, não se fundem. Assim, quando o processo de fissão ocorre, a estrutura interna da mitocôndria é dividida aleatoriamente, perturbando as cristas e criando a estrutura vesicular interna observada.

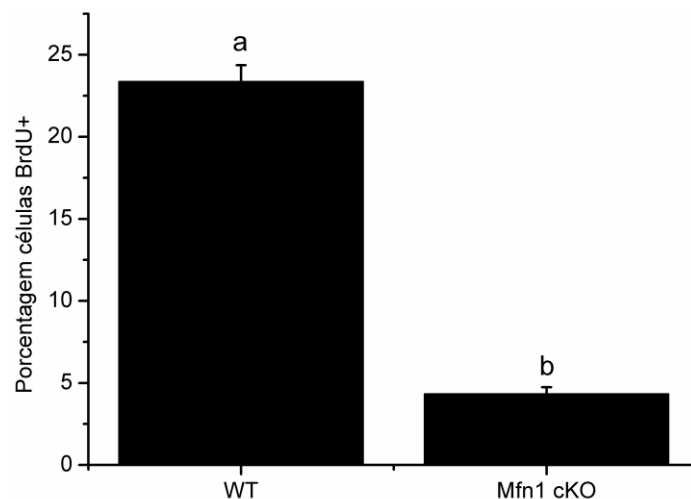
### 6.1.2. Proliferação celular

Animais pertencentes ao grupo *Mfn1* cKO e ao grupo WT foram injetados intraperitonealmente com BrdU e os ovários coletados após 2 horas para processamento e corte de secções histológicas. As secções foram utilizadas para imunofluorescência com anticorpo primário anti-BrdU (figura 6). Na análise, foram determinados tanto o número de células positivas para BrdU quanto o número de células pertencentes à secção analisada de cada folículo.



**Figura 6:** Imagens microscópio epifluorescência de cortes congelados de ovários contendo oócitos WT (a) e oócitos *Mfn1* cKO (b) tratados com anticorpo anti BrdU.

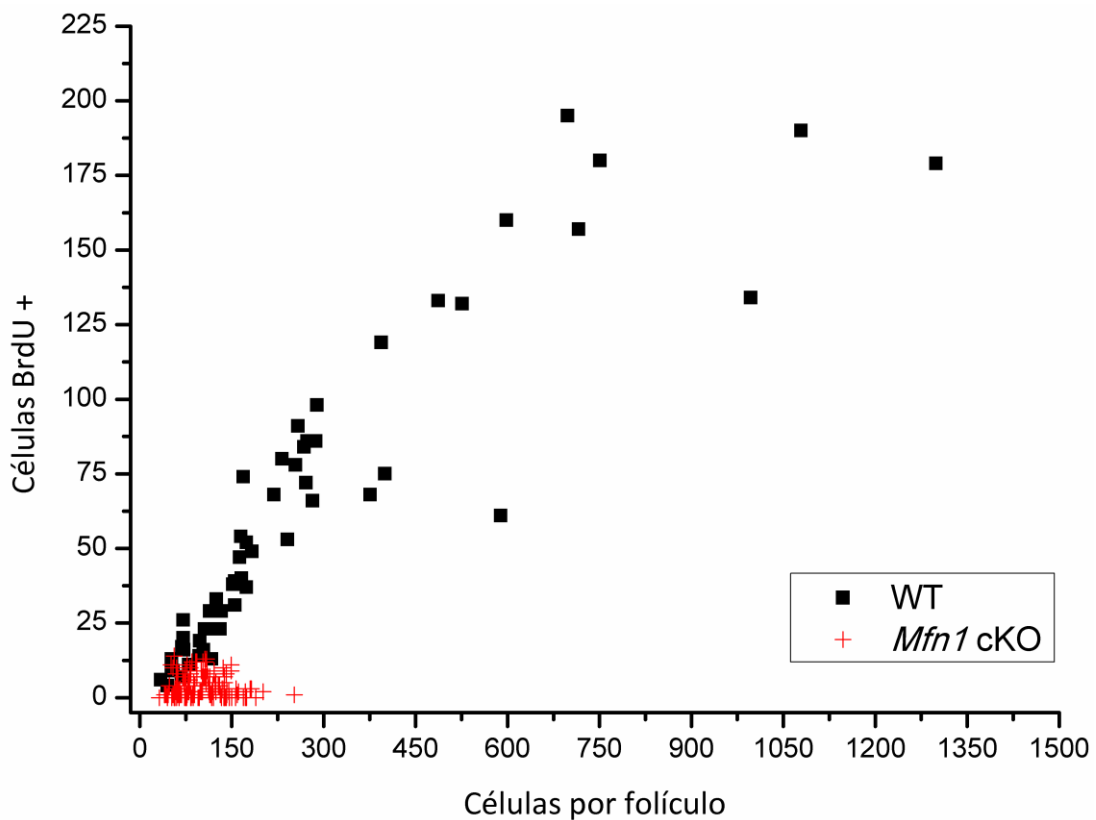
De posse desses dados, o nível de replicação das células da granulosa foi avaliado conforme a porcentagem de células positivas para BrdU de cada folículo analisado (Figura 7). O grupo WT apresentou, em média, porcentagem de  $23,37 \pm 0,99$  de células replicativas nos folículos analisados. Para o grupo *Mfn1* cKO esse número foi de  $4,34 \pm 0,40$ ; ou seja, o cKO de *Mfn1* levou a uma diminuição de aproximadamente 81% nos níveis de replicação das células da granulosa.



**Figura 7:** Análise de proliferação celular pelo cálculo da porcentagem de células positivas para BrdU em ambos os grupos experimentais. Letras diferentes sobre as barras indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Levando-se em consideração o número total de células de cada secção dos folículos analisados, pode-se construir um gráfico de dispersão para analisar o

padrão de desenvolvimento dos folículos WT *versus* o dos folículos *Mfn1* cKO, conforme observado na figura 8.



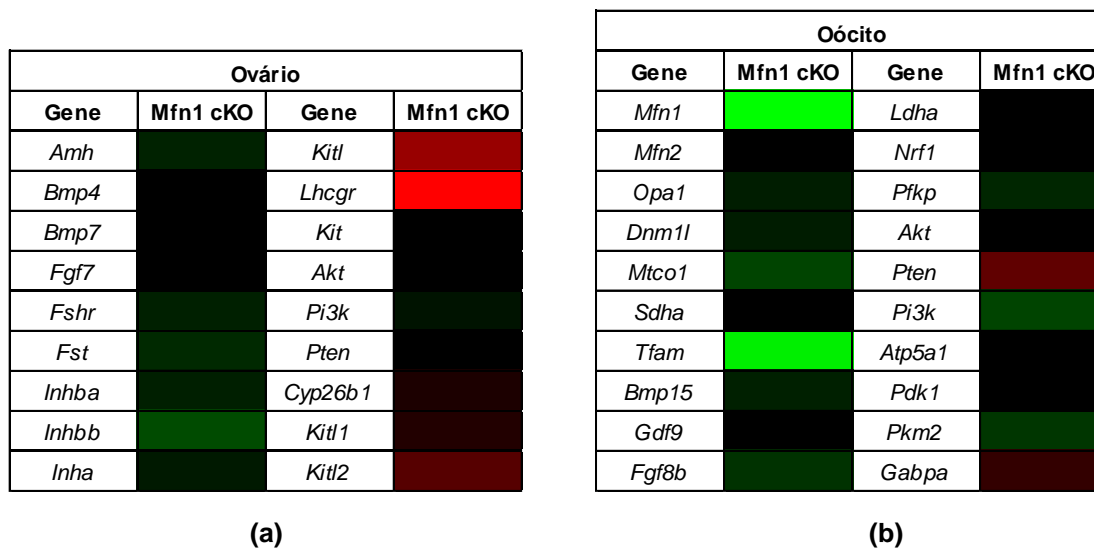
**Figura 8:** Associação entre o tamanho do folículo (número de células por secção) e número de células em replicação (BrdU+) para ambos os grupos experimentais.

Analisando-se o gráfico presente na figura acima percebe-se que, para o grupo WT, à medida em que o folículo analisado tem um maior número de células por secção ele também apresenta um número aumentado de células em replicação. A longo prazo, esse cenário leva ao aparecimento de folículos maiores, conforme também evidenciado pelo gráfico, pois o total de células aumenta e o folículo progride na foliculogênese, acompanhado pelo crescimento do oócito. No caso do grupo *Mfn1* cKO, o mesmo padrão não é observado, e o número de células em replicação permanece baixo apesar de o total de células por secção aumentar. Também é válido chamar atenção ao fato de que o grupo *Mfn1* cKO não apresentou folículo com mais de 300 células por secção, o que corrobora o fenótipo inicial de desenvolvimento interrompido e completa falha na ovulação.

### 6.1.3. Expressão gênica

Com o intuito de investigar o efeito do cKO sobre várias vias de sinalização, o nível de diversos transcritos foi medido em oócitos imaturos e ovários *Mfn1* cKO e

WT por qPCR. A figura 9 apresenta os resultados gerais da análise dos tecidos cKO em relação aos WT.



(a)

(b)

Magnitude da mudança na expressão:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10
aumento	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
diminuição	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black

**Figura 9:** *Heatmap* ilustrando o resultado geral da análise de expressão gênica realizado utilizando-se cDNA proveniente de (a) ovários ou de (b) oócitos imaturos desnudos. A presença de cores indica diferença significativa nos níveis de mRNA com  $P < 0,05$  para cada gene.

De modo geral, o grupo *Mfn1* cKO apresentou uma diminuição na quantidade de transcritos da maior parte dos genes analisados. A diminuição global de transcritos no oócito, com exceção de *Pten* e *Gabpa*, é condizente com o fenótipo de desenvolvimento folicular bloqueado e crescimento deficiente (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998; FAIR, 2010), pois os oócitos não completaram seu crescimento e, conseqüentemente, não acumulam os transcritos que supostamente acumulariam nessa etapa do desenvolvimento. Fora isso, a diminuição nos níveis de transcritos pode indicar diminuição no nível de proteína, o que sugere deficiência no processo ao qual o gene em questão pertence. Por exemplo, analisando-se a expressão no oócito dos genes relacionados à dinâmica mitocondrial (tabela 4), nota-se diminuição na quantidade de transcritos para *Opa1*. Como uma das funções da OPA1 também é organizar a morfologia das cristas mitocondriais (PATTEN et al., 2014), percebemos que este dado dá suporte às análises de microscopia eletrônica, que revelaram mitocôndrias com estrutura interna descaracterizada. Além disso, também notamos a completa ausência de transcritos *Mfn1*, validando nosso modelo de cKO.



**Tabela 4:** Níveis relativos de transcritos relacionados à Dinâmica Mitocondrial

Tecido	Gene	WT $\pm$ SEM	<i>Mfn1</i> cKO $\pm$ SEM	P value
Oócito imaturo	<i>Mfn1</i>	1 $\pm$ 0,335	4,55E-6 $\pm$ 1,10E-4 <sup>a</sup>	<0,00001
	<i>Mfn2</i>	1 $\pm$ 0,191	0,745 $\pm$ 0,102	0,2549
	<i>Opa1</i>	1 $\pm$ 0,120	0,624 $\pm$ 0,057 <sup>a</sup>	0,0113
	<i>Dnm1l</i>	1 $\pm$ 0,136	0,629 $\pm$ 0,103 <sup>a</sup>	0,0439

A função mitocondrial depende tanto da integridade do mtDNA quanto da integração e coordenação entre nDNA e mtDNA, pois ambos codificam proteínas importantes como, por exemplo, as que compõem as subunidades da cadeia transportadora de elétrons. Assim, é necessária uma fina regulação dos genes codificados por ambos os genomas, e tal tarefa é desempenhada por fatores de transcrição como *Nrf1* e *Nrf2* (*Gabpa*, em camundongos). Tais fatores de transcrição controlam, a nível nuclear, a expressão de proteínas pertencentes ao processo de fosforilação oxidativa e também de fatores de transcrição que, uma vez importados pela mitocôndria, coordenam a transcrição, a replicação e a tradução do mtDNA (CHIARATTI et al., 2011). Em nosso modelo, apesar dos níveis de *Nrf1* se mostrarem normais e os de *Nrf2* aumentados (tabela 5), a quantidade relativa de *Tfam* se apresentou diminuída. Tal gene codifica para a proteína Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) que, além de integrar o nucleóide do mtDNA, tem funções importantes na manutenção e na replicação dessa molécula e é, assim, indispensável para a fertilidade de mamíferos (WAI et al., 2010). A diminuição nos níveis de *Tfam*, além de justificar a queda no número de cópias apresentado por oócitos *Mfn1* cKO (dados não publicados), indica que a atividade mitocondrial está prejudicada, em consonância com as análises de microscopia eletrônica de transmissão e diminuição dos níveis de *Mtco1*.

**Tabela 5:** Níveis relativos de transcritos relacionados à função mitocondrial

Tecido	Gene	WT $\pm$ SEM	<i>Mfn1</i> cKO $\pm$ SEM	P value
Oócito imaturo	<i>Tfam</i>	1 $\pm$ 0,438	0,076 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>	0,0196
	<i>Nrf1</i>	1 $\pm$ 0,225	0,732 $\pm$ 0,127	0,3143
	<i>Gabpa</i>	1 $\pm$ 0,605	1,398 $\pm$ 0,159	0,0048
	<i>Mtco1</i>	1 $\pm$ 0,210	0,264 $\pm$ 0,051 <sup>a</sup>	0,0067
	<i>Sdha</i>	1 $\pm$ 0,421	0,074 $\pm$ 0,012	0,0681
	<i>Atp5a1</i>	1 $\pm$ 0,277	1,426 $\pm$ 0,428	0,4142

Além do fenótipo relacionado à mitocôndria, oócitos *Mfn1* cKO apresentaram crescimento limitado e deficiência na progressão da foliculogênese. A análise das quantidades de transcritos relacionados à via PI3K/PTEN/Akt (tabela 6), que tem papel importante no recrutamento e no crescimento de oócitos (CECCONI et al., 2012), auxiliou no entendimento deste fenótipo: apesar de os níveis de *Akt* e *Pdk1* estarem inalterados, foi verificada uma queda nos níveis de *Pi3k* e um aumento de mais de 5 vezes no nível do transcrito *Pten*, gene que codifica para um importante modulador negativo da via, sugerindo a interrupção no crescimento por possível inibição da via PI3K/PTEN/Akt.

**Tabela 6:** Níveis relativos de transcritos relacionados à via PI3K/PTEN/Akt no oócito

Tecido	Gene	WT $\pm$ SEM	<i>Mfn1</i> cKO $\pm$ SEM	P value
Oócito imaturo	<i>Akt</i>	1 $\pm$ 0,306	1,016 $\pm$ 0,268	0,9644
	<i>Pten</i>	1 $\pm$ 0,217	5,298 $\pm$ 1,494 <sup>a</sup>	0,0107
	<i>Pi3k</i>	1 $\pm$ 0,143	0,267 $\pm$ 0,059 <sup>a</sup>	0,0002
	<i>Pdk1</i>	1 $\pm$ 0,179	0,958 $\pm$ 0,421	0,9298

Outro fato que vai ao encontro com o fenótipo de crescimento deficiente é a diminuição na quantidade de mRNA de fatores parácrinos secretados pelo oócito (tabela 7). Essas proteínas, codificadas pelos genes *Bmp15* e *FGF8b*, ao encontrarem receptores do tipo serina/treonina quinase na superfície das células da granulosa, ativam PI3K e Akt, que por sua vez vão iniciar processos celulares que envolvem transcrição, tradução, proliferação, organização do citoesqueleto, etc, atividades diretamente relacionadas com a ação dos complexos 1 e 2 de mTOR (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014). Há vários relatos na literatura que corroboram o importante papel dessa via na ativação e na manutenção da dormência de folículos primordiais, na ativação e na manutenção de oócitos e, também, no estímulo para proliferação e na diferenciação de células da granulosa (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014).

**Tabela 7:** Níveis relativos de transcritos de fatores parácrinos secretados pelo oócito

Tecido	Gene	WT $\pm$ SEM	<i>Mfn1</i> cKO $\pm$ SEM	P value
Oócito imaturo	<i>Bmp15</i>	1 $\pm$ 0,172	0,553 $\pm$ 0,085 <sup>a</sup>	0,0193
	<i>Gdf9</i>	1 $\pm$ 0,107	0,878 $\pm$ 0,084	0,3810
	<i>Fgf8b</i>	1 $\pm$ 0,180	0,361 $\pm$ 0,056 <sup>a</sup>	0,0069

Deste modo, a investigação dos transcritos da via PI3K/PTEN/Akt nas células somáticas do ovário se torna muito importante, principalmente nas células da granulosa. Como os folículos contendo oócitos *Mfn1* cKO apresentam um número baixo de células da granulosa, optou-se por realizar a análise desses e de outros transcritos importantes para o desenvolvimento da foliculogênese a partir de cDNA obtido do ovário como um todo. Como resultado, os níveis de transcritos para *Pi3k* também se mostraram alterados no ovário (tabela 8), um indício de que a via em questão está deficiente no conjunto de células somáticas do ovário *Mfn1* cKO.

**Tabela 8:** Níveis relativos de transcritos relacionados à via PI3K/PTEN/Akt no ovário

Tecido	Gene	WT ± SEM	<i>Mfn1</i> cKO ± SEM	P value
Ovário	<i>Akt</i>	1 ± 0,071	0,914 ± 0,112	0,5296
	<i>Pi3k</i>	1 ± 0,053	0,757 ± 0,049 <sup>a</sup>	0,0049
	<i>Pten</i>	1 ± 0,122	1,206 ± 0,168	0,3361

Em relação à taxa de proliferação das células da granulosa, verificou-se que os níveis de *Cyp26b1*, um gene naturalmente reprimido nas células da granulosa durante a foliculogênese por regular negativamente proliferação celular (KIPP et al., 2011; DEMCZUK et al., 2016), mostrou-se aumentado em ovários *Mfn1* cKO, apresentando média de 1 ± 0,181 para o grupo WT e 1,903 ± 0,356 para o grupo *Mfn1* cKO, com P value de 0,0401. Além da falta de estímulo para crescimento e do aumento na repressão de replicação nas células da granulosa, a análise do nível de transcritos no ovário revelou que a expressão de fatores relacionados à progressão da foliculogênese estava diminuída (tabela 9). Genes como *Amh*, *Fshr*, *Fst*, *Inha*, *Inhba*, *Inhbb*, que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento do folículo e com a replicação das células da granulosa (MATZUK; BURNS, 2012), apresentaram redução de pelo menos 50% de seu conteúdo quando comparado com o grupo WT.

**Tabela 9:** Níveis relativos de transcritos relacionados à progressão da foliculogênese

Tecido	Gene	WT ± SEM	<i>Mfn1</i> cKO ± SEM	P value
Ovário	<i>Amh</i>	1 ± 0,115	0,434 ± 0,064 <sup>a</sup>	0,0007
	<i>Bmp4</i>	1 ± 0,107	1,270 ± 0,195	0,2459
	<i>Bmp7</i>	1 ± 0,217	1,046 ± 0,199	0,8785
	<i>Fgf7</i>	1 ± 0,147	1,024 ± 0,138	0,9059

<i>Fshr</i>	1 ± 0,085	0,470 ± 0,064 <sup>a</sup>	0,0002
<i>Fst</i>	1 ± 0,094	0,361 ± 0,081 <sup>a</sup>	0,0001
<i>Inhba</i>	1 ± 0,235	0,473 ± 0,198 <sup>a</sup>	0,0412
<i>Inhbb</i>	1 ± 0,315	0,201 ± 0,062 <sup>a</sup>	0,0025
<i>Inha</i>	1 ± 0,120	0,601 ± 0,100 <sup>a</sup>	0,0165
<i>Lhcgr</i>	1 ± 0,108	4,107 ± 0,619 <sup>a</sup>	0,0014
<i>Kit</i>	1 ± 0,155	1,242 ± 0,253	0,4283
<i>Kitl</i>	1 ± 0,220	3,178 ± 0,435 <sup>a</sup>	0,0005
<i>Kitl1</i>	1 ± 0,227	2,287 ± 0,187 <sup>a</sup>	0,0007
<i>Kitl2</i>	1 ± 0,190	5,712 ± 0,911 <sup>a</sup>	<0,0001

Em uma situação normal, o FSH secretado pela glândula pituitária, quando em contato com as células da granulosa, estimula a expressão de receptores FSHR. Este, por sua vez, interage com FSH presente no meio e ativa a expressão de diversos genes, entre eles o que codifica o receptor de LH (*Lhcgr*) (ZELEZNIK; MIDGLEY; REICHERT, 1974). Este evento marca a progressão do folículo para o estágio pré-ovulatório que agora expressa LHCGR nas células murais da granulosa. As células do cumulus, apesar de também entrarem em contato com FSH devido à sua difusão no fluido antral, não expressam FSHR pois estão sob ação de BMP15. Esta proteína é um importante fator parácrino secretado pelo oócito que tem como uma de suas funções inibir a expressão de FSHR nas células do cumulus (OTSUKA et al., 2001), preservando a diferenciação entre as duas populações de células da granulosa. No caso de folículos contendo oócitos *Mfn1* cKO, com a baixa expressão de *Bmp15*, as células da granulosa mais próximas do oócito, as quais não deveriam sofrer influência do FSH nem expressar FSHR, passam a fazê-lo e, conseqüentemente, também podem expressar *Lhcgr*. De acordo com o descrito por SHI e SEGALOFF (1995), o estímulo por FSH é capaz de aumentar em até 10 vezes o nível de transcrição de *Lhcgr*, e a presença do hormônio contribui para a estabilização deste transcrito, fatos que podem explicar o resultado obtido mesmo com a diminuição do nível de *Fshr* nos ovários *Mfn1* cKO.

Já o gene *Kitl* (KNIGHT; GLISTER, 2006) tem papel importante durante o recrutamento de folículos primordiais (PARROTT; SKINNER, 1999) e no crescimento do oócito, tendo sua expressão nas células da granulosa a partir de então controlada pelo próprio gameta, que passa a inibi-la nas CC uma vez que atinge seu diâmetro

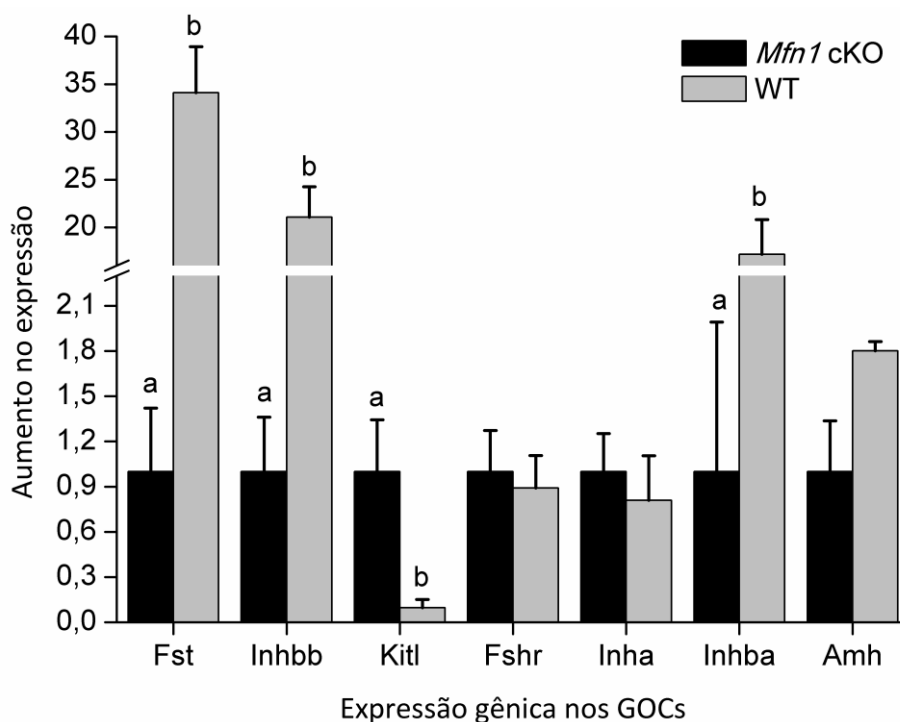
máximo (JOYCE et al., 1999). Uma análise geral indicou aumento de mais de 3 vezes na quantidade de transcritos para *Kitl* no ovário *Mfn1* cKO. No entanto, o transcrito de *Kitl* passa por um processo de *splicing* alternativo, podendo dar origem a uma isoforma solúvel, denominada *Kitl1*, e outra insolúvel que permanece ligada à membrana das células da granulosa, o *Kitl2* (CLARKE, 2018). THOMAS et al. (2008) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de *Kitl2* promover crescimento e sobrevivência do oócito. No nosso modelo, foi verificado um aumento de mais de 5 vezes nos níveis do transcrito para *Kitl2*, fato que pode indicar uma regulação no sentido de compensar a deficiência no crescimento de oócitos *Mfn1* cKO. Neste caso, o aumento dos níveis de *Kitl2* e sua capacidade de promover a sobrevivência do oócito, também poderiam explicar o fato de os folículos *Mfn1* cKO não entrarem em processo de degeneração e se acumularem no ovário. Ainda assim, o aumento na expressão de *Kitl* pode ser associada a deficiência de GDF9, que comprovadamente é secretada pelo oócito e regula a expressão desse fator pelas células da granulosa (WU et al., 2004). Apesar de não ter sido observada diferença significativa nos níveis de transcrito para *Gdf9*, dados obtidos pelo nosso grupo indicam diminuição nos níveis proteicos de GDF9 (dados não mostrados).

No geral, a análise da expressão gênica em nível de mRNA mostrou que no ovário *Mfn1* cKO há deficiência de produção de fatores parácrinos pelo oócito. Estes fatores, que deveriam auxiliar na ativação e no processo de diferenciação das células somáticas presentes no folículo, não o fazem. Estas células somáticas, entre elas as células da granulosa e as células da teca, não se desenvolvem e perdem a capacidade de apoiar o desenvolvimento do oócito. Desta forma, a deficiência de *Mfn1* no oócito parece interromper a foliculogênese como evidenciado pela baixa expressão de importantes genes envolvidos no desenvolvimento folicular. Esses achados também estão em acordo com nossos dados prévios de que animais *Mfn1* cKO são inférteis e apresentam falha na ovulação.

#### **6.1.4. Co-cultivo**

De posse das evidências de que o desenvolvimento do folículo *Mfn1* cKO foi interrompido por deficiência na produção e na secreção de fatores parácrinos pelo oócito, realizou-se um experimento de co-cultivo. Este experimento teve como objetivo avaliar se GOCs contendo oócitos *Mfn1* cKO eram capazes de retomar a expressão de fatores chave da foliculogênese quando cocultivados com oócitos WT

em fase de crescimento. O resultado da quantificação relativa dos transcritos encontra-se na figura 10 abaixo.



**Figura 10:** Expressão gênica dos GOCs *Mfn1* cKO cocultivados com óocitos *Mfn1* cKO (controle) ou com óocitos WT. Letras sobre as barras indicam diferença significativa com  $P < 0,05$ .

A presença de óocitos WT no meio de cultivo durante as 24 horas nas quais o experimento foi realizado mostrou-se capaz de recuperar a expressão de fatores chave como *Fst*, *Inhba*, *Inhbb* e *Kitl*. Esses resultados indicam, então, que a provável deficiência de óocitos *Mfn1* cKO na secreção de fatores parácrinos foi responsável pelos efeitos observados sobre a foliculogênese (UDAGAWA et al., 2014). No entanto, não se pode afirmar que isto tenha se dado por um papel direto da falta de *Mfn1*.

De acordo com a segunda parte da hipótese levantada, é possível que a relação entre as quantidades de MFN1 e de MFN2 seja importante para o desenvolvimento do óocito. Essa possibilidade é, então, investigada na próxima seção por meio da superexpressão de MFN2 ou MFN1+MFN2 durante o crescimento *in vitro* do óocito, com o intuito de verificar se o excesso de MFN2 em relação a MFN1 é prejudicial para o óocito.

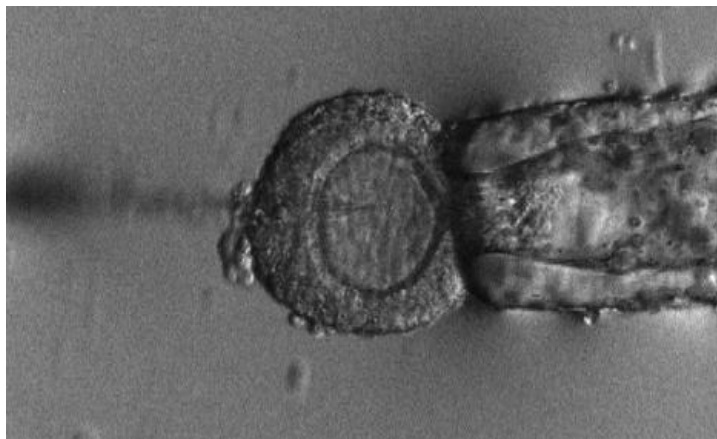
**PARTE 2:**  
SUPEREXPRESSÃO DE MITOFUSINA 1 E 2

---

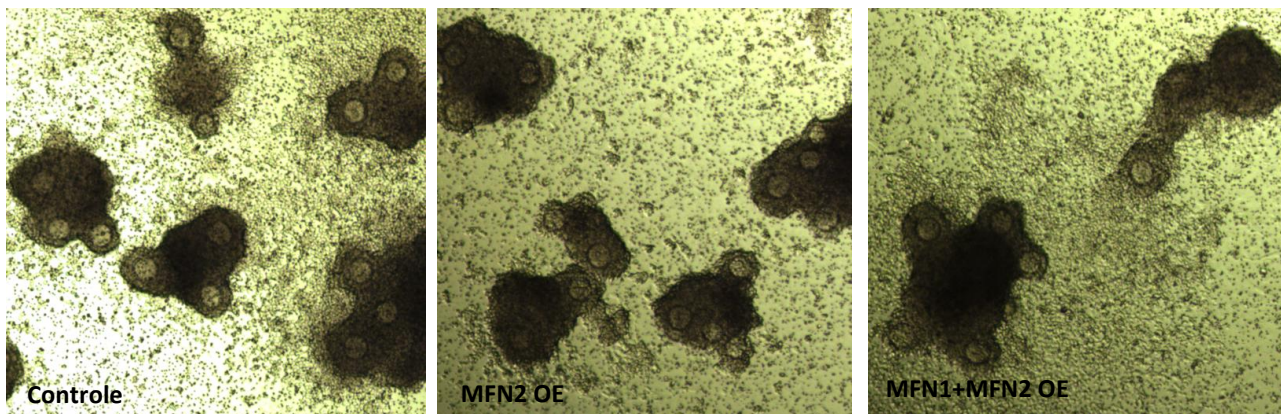
## 6.2. PARTE 2: SUPEREXPRESSÃO DE MITOFUSINA 1 E 2

### 6.2.1. Coleta de GOCs, microinjeção e cultivo

Os plasmídeos para superexpressão das mitofusinas fusionadas a cauda Myc foram obtidos e utilizados para síntese de cRNA. Os GOCs para microinjeção foram sempre coletados pela manhã e as microinjeções (Figura 11a) realizadas no período da tarde para os três grupos experimentais. Ao final do cultivo, os GOCs injetados tinham uma aparência normal e continham uma grande quantidade de células da granulosa associadas ao oócito, como ilustrado nas figuras 11b, c, d.



(a)



(b)

(c)

(d)

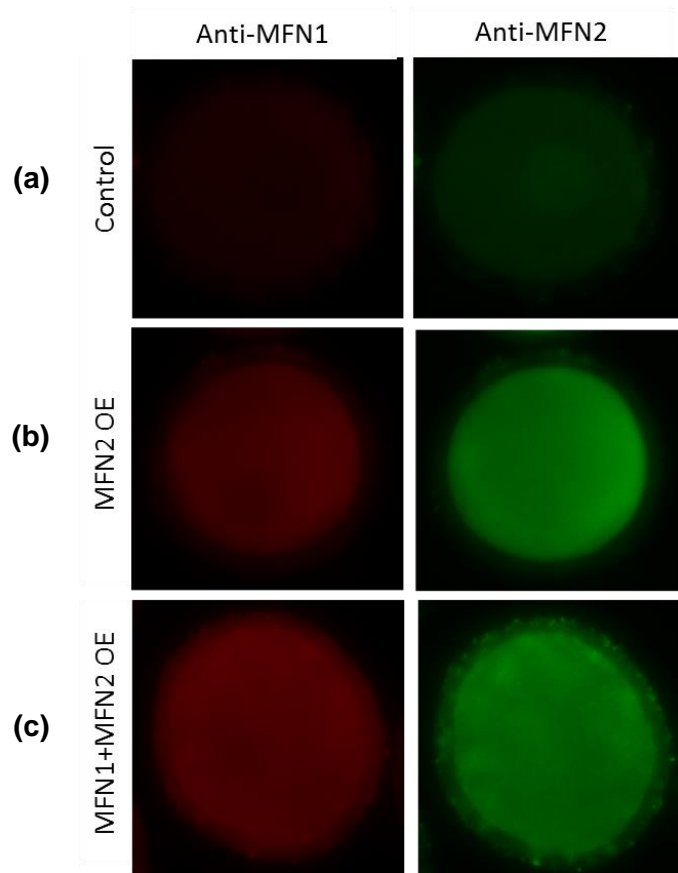
**Figura 11:** Imagem ilustrando o processo de microinjeção (a) e imagens obtidas dos GOCs após os 7 dias de cultivo para cada grupo experimental, (b) Controle (c) MFN2 OE e (d) MFN1+MFN2 OE.

### 6.2.2. Validação do modelo

Devido à dificuldade em se obter amostras para análise, oócitos desnudos pós cultivo foram agrupados em pools de 30 para realização do *western blot*. Infelizmente, com essa quantidade de material por réplica, não foi possível identificar

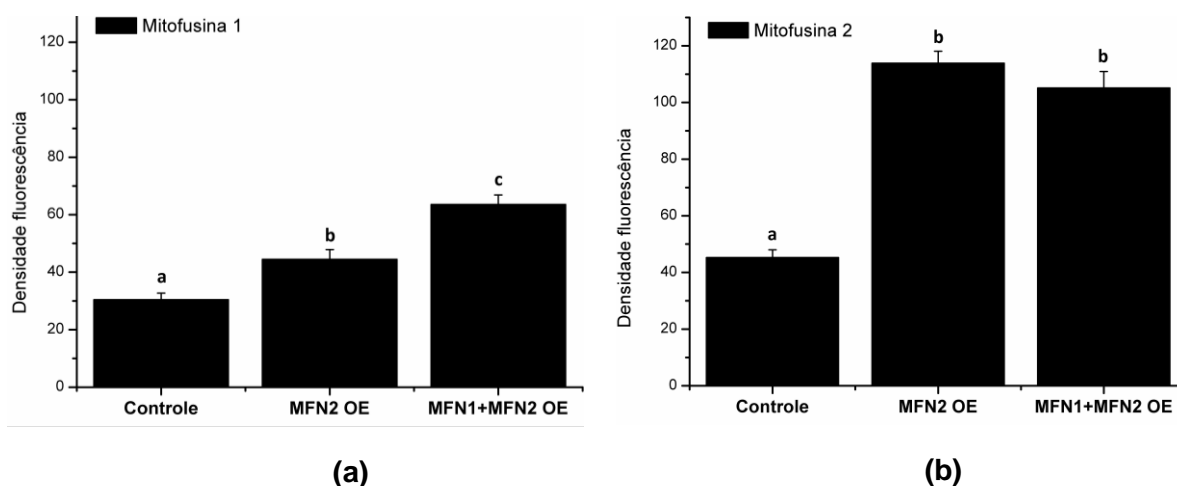


os níveis endógenos das Mitofusinas. Como alternativa, oócitos foram marcados com anticorpo anti-MFN1 e anti-MFN2, com objetivo de verificar os níveis aumentados de MFN2 e de MFN1+MFN2 (figura 12).



**Figura 12:** Imagens obtidas com microscópio de epifluorescência a partir de amostras de oócitos submetidos a imunofluorescência com anticorpos contra MFN1 e MFN2 para os grupos controle não injetado (a), MFN2 OE (b) e MFN1+MFN2 OE (c).

A partir da quantificação das imagens obtidas por imunofluorescência, confirmou-se a superexpressão de MFN1 e MFN2 em cada grupo experimental quando comparado com oócitos cultivados sem nenhuma injeção de cRNA, apenas para esta etapa de validação (figura 13).



**Figura 13:** Resultados da quantificação dos níveis de fluorescência obtidos quando o anticorpo utilizado era contra (a) MFN1 ou (b) MFN2.

No entanto, ao contrário do que era esperado, observou-se um aumento no nível de MFN1 no grupo MFN2 OE, e não apenas no grupo MFN1+MFN2 OE, talvez devido a alguma resposta compensatória. Tal fato pode ser um sinal de que o balanço entre as quantidades de Mitofusinas 1 e 2 seja importante. Seguindo esta linha de raciocínio, os dados coletados puderam ser analisados levando-se em consideração a razão MFN2/MFN1 e os resultados estão resumidos na tabela 10. Os números obtidos mostram quão próximo do grupo controle o grupo MFN1+MFN2 OE está nesse quesito, se considerarmos a razão MFN2/MFN1 importante para o desenvolvimento do oócito, de acordo com o que foi proposto na hipótese inicial.

**Tabela 10:** Razão MFN2/MFN1

Grupo experimental	Razão MFN2/MFN1
Controle	1
MFN2 OE	1,719683
MFN1+MFN2 OE	1,111707

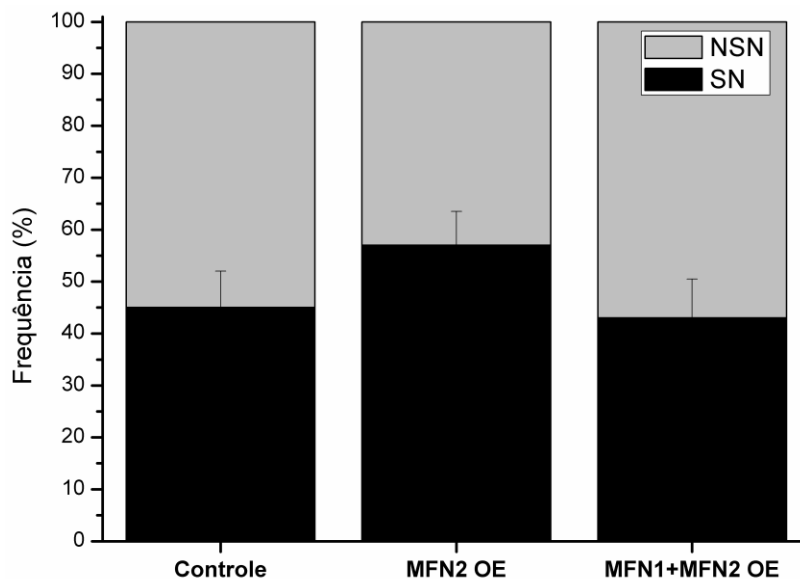
### 6.2.3. Crescimento e desenvolvimento do oócito

Para avaliar a competência de desenvolvimento dos oócitos microinjetados e cultivados, o plano inicial era realizar ensaios de maturação *in vitro*. No entanto, após a realização de duas rodadas de ensaios de maturação *in vitro*, foi notado que nenhum dos oócitos foi capaz de atingir o estágio MII, e apenas de 50% dos oócitos de cada grupo atingiu o estágio MI. Como os oócitos apresentavam morfologia normal e uma grande quantidade de células da granulosa, foi elaborada a hipótese

de que 7 dias pode ser um período curto para que os oócitos completem a maturação citoplasmática após o estresse do processo de microinjeção. Assim, ao invés de se aumentar o período de cultivo, os oócitos tiveram a razão SN/SNS (*Surrounding Nucleolus/Not Surrounding Nucleolus*) determinada em uma tentativa de aferir sua capacidade de desenvolvimento.

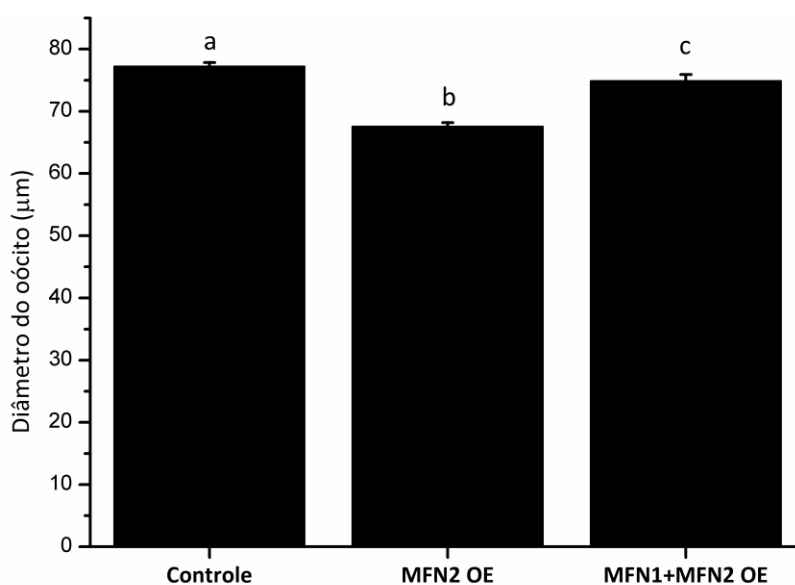
A existência de diferentes padrões organizacionais de cromatina em oócitos de camundongos GV totalmente crescidos foi descrita pela primeira vez por Britta Mattson e David Albertini em 1990 (MATTSON; ALBERTINI, 1990). Três anos depois, DEBEY et al. (1993) simplificou a classificação, reduzindo-a a dois padrões gerais de cromatina: o *surrounding nucleolus* (onde o nucléolo é circundado pela cromatina) e o *not surrounding nucleolus* (onde o nucléolo não é circundado pela cromatina). Eles também determinaram que esses dois estágios não são intercambiáveis e que a proporção de cada um deles é geralmente igual, sendo sua ocorrência não dependente da presença de células do cumulus nem da idade do camundongo (DEBEY et al., 1993). Além disso, ZUCCOTTI et al. (2002) mostraram diferenças de desenvolvimento entre oócitos com configuração de cromatina NSN e SN: quando em cultivo, ambos os grupos são capazes de retomar a meiose e atingir o estágio MII; no entanto, quando fertilizados, os oócitos NSN tem desenvolvimento interrompido no estágio embrionário de duas células enquanto os SN desenvolvem a termo.

Dito isto, a relação SN/NSN pode ser um bom indicador da competência de desenvolvimento do oócito para cada grupo. De acordo com a hipótese, esperava-se que o grupo MFN2 OE apresentasse menor competência de desenvolvimento quando comparado aos grupos controle e MFN1+MFN2 OE. Esta competência de desenvolvimento relativamente inferior poderia de alguma forma se traduzir em um número maior de oócitos NSN no grupo MFN2 OE, mas a análise, no entanto, não mostrou diferença significativa na relação SN/NSN entre os grupos (figura 14).



**Figura 14:** Resultados da análise da razão SN/NSN após microinjeção e cultivo de todos os grupos experimentais.

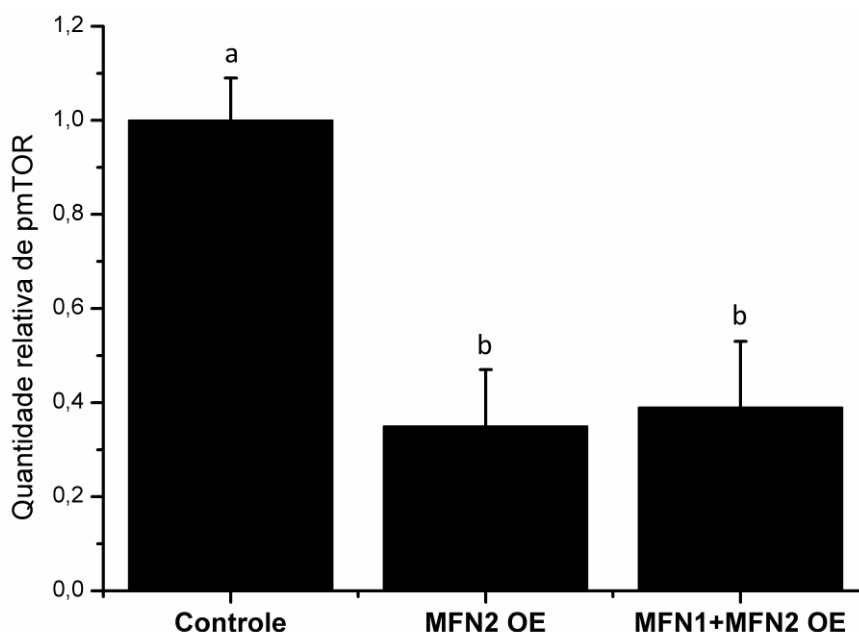
Os oócitos cultivados também foram avaliados quanto à diferença no diâmetro após o período de cultivo (Figura 15). Esta análise mostrou-se bastante robusta, pois foi capaz de mostrar uma diferença estatística e relevante entre os três grupos experimentais: considerando-se a diferença entre o diâmetro inicial e final dos oócitos WT ( $58 \pm 0,7 \mu\text{m}$  e  $77,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ , respectivamente) como o crescimento esperado, percebe-se que o grupo MFN1+MFN2 OE cresceu 87% desse total esperado e o grupo MFN2 OE, apenas 47,5%.



**Figura 15:** Resultados da análise do crescimento do oócito após microinjeção e cultivo para todos os grupos experimentais. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa com  $P < 0,05$ .

Este resultado é interessante porque além do fato de os oócitos MFN2 OE terem crescido menos que os grupos MFN1+MFN2 OE e controle, eles nem sequer alcançaram 70  $\mu\text{m}$  de diâmetro total ( $67,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ), que é um marcador morfológico clássico de oócitos totalmente crescidos (DEBEY et al., 1993). Portanto, pode-se concluir que o crescimento dos oócitos superexpressando MFN2 foi prejudicado, o que não ocorreu na mesma medida para os oócitos MFN1+MFN2 OE ( $74,9 \pm 1,0 \mu\text{m}$ ) que ultrapassaram a marca dos 70  $\mu\text{m}$  mas, ainda assim, não cresceram tanto quanto o grupo controle ( $77,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ).

O comprometimento do crescimento pode ser um indicativo de que as vias Pi3K/PTEN/Akt e mTORC2/Akt estão inibidas. Para investigar melhor este fato, os níveis proteicos de Akt, pAkt e pmTOR foram avaliados. Infelizmente, o baixo número de oócitos utilizados (30 por replicata) não foi suficiente para detectar os níveis de pAkt, mas a análise da quantidade de pmTOR mostrou menor ativação do complexo mTOR nos oócitos MFN2 OE e MFN1+MFN2 OE em comparação ao do grupo controle (figura 16).



**Figura 16:** Resultados para a quantificação dos níveis proteicos de pmTOR para os grupos experimentais. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa com  $P < 0,05$ .

Apesar do fato de que a diferença entre os grupos superexpressando Mitofusinas e o de controle ser impressionante, este resultado não explica completamente os dados obtidos para o crescimento. Esperava-se que a quantidade de pmTOR nos oócitos MFN2 OE fosse menor que nos demais grupos, com

MFN1+MFN2 OE apresentando valores intermediários ou equivalentes de controle, seguindo a hipótese inicial de que o balanço entre as quantidades de MFN1 e MFN2 é importante para o desenvolvimento do oócito.

Em fibroblastos embrionários de camundongo (MEF), o *knock down* de MFN2 levou a um aumento de duas vezes na taxa de proliferação celular, fenótipo que foi revertido com a restauração da expressão da proteína (CHEN et al., 2004). CHEN et al. (2014) demonstraram o mecanismo pelo qual MFN2 interage com Ras e controla a proliferação celular. Além disso, vários relatos ligam a maior expressão de MFN2 em tumores com melhores prognósticos devido ao controle que MFN2 exerce sobre as vias Pi3K/PTEN/Akt e mTORC2/Akt (ZHANG et al., 2013; MA et al., 2015; XU et al., 2017). Ras, uma vez ativada, pode interagir e estimular Pi3K diretamente e, por meio de seus efetores, também controla a atividade de mTORC1 (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014). E mTORC2, por sua vez, pode ser inibido diretamente por MFN2, mediante interação deste com o domínio HR1 daquele, conforme demonstrado em células tumorais (XU et al., 2017). Assim, a partir destas evidências e dos dados coletados, pode-se inferir que, ao contrário do que estabelece a hipótese original, não é apenas o balanço entre MFN1 e MFN2 que importa para o correto desenvolvimento do oócito. Isso por que quando a quantidade de ambas as Mitofusinas é aumentada, o número de homodímeros de MFN2 também cresce, levando assim ao aumento do controle sobre vias importantes de sinalização como Pi3K/PTEN/Akt e mTORC2/Akt. Pode ser que a magnitude da inibição não seja a mesma, e para investigar mais a fundo essa questão, novos experimentos deverão ser realizados.

## **CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares envolvidos com a infertilidade de fêmeas murinas *Mfn1* cKO. De acordo com a hipótese inicial, a eliminação de *Mfn1* durante o crescimento do oócito implica em duas principais consequências *i)* bloqueio na comunicação oócito-granulosa, interrompendo o desenvolvimento folicular devido à *ii)* alteração do balanço entre Mitofusina 1 e Mitofusina 2, necessário ao desenvolvimento do oócito.

Evidências acerca do bloqueio na comunicação oócito-granulosa foram levantadas e estas incluem a menor taxa de proliferação das células da granulosa em ovários *Mfn1* cKO, os baixos níveis de transcritos relacionados à progressão da foliculogênese, bem como de transcritos que codificam fatores determinantes na comunicação oócito-granulosa. Ainda, o co-cultivo de oócitos WT com complexos oócito-granulosa *Mfn1* cKO reforçou a hipótese de falha na comunicação, pois fatores secretados pelos oócitos foram capazes de restaurar a expressão de genes necessários à regulação da foliculogênese após 24 horas de cultivo.

Já a superexpressão de MFN2 e de MFN1+MFN2 durante o crescimento *in vitro* do oócito foi de suma importância para investigar o impacto do balanço na expressão de MFN1 e MFN2 sobre o desenvolvimento do oócito. De fato, a superexpressão de MFN1+MFN2 possibilitou o crescimento do oócito, ao contrário do que ocorreu quando apenas MFN2 foi superexpresso.

Assim, uma vez que se elimina *Mfn1*, com consequente perda de MFN1, a quantidade absoluta de dímeros MFN2-MFN2 aumenta, assim como a inibição sobre as vias mTORC2/Akt, interrompendo o desenvolvimento do oócito, que interrompe a produção de proteínas importantes, entre elas fatores de comunicação oócito-granulosa. Desta forma, a comunicação entre o gameta e as células da granulosa é comprometida e o desenvolvimento do folículo é interrompido, levando as fêmeas *Mfn1* cKO à completa infertilidade.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-ALAVI, M. V.; BETTE, S.; SCHIMPF, S.; SCHUETTAUF, F.; SCHRAERMAYER, U.; WEHRL, H. F.; RUTTIGER, L.; BECK, S. C.; TONAGEL, F.; PICHLER, B. J.; KNIPPER, M.; PETERS, T.; LAUFS, J.; WISSINGER, B. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. **Brain**, v. 130, n. 4, p. 1029–1042, 2007.

-ALEXANDER, C.; VOTRUBA, M.; PESCH, U. E.; THISELTON, D. L.; MAYER, S.; MOORE, a; RODRIGUEZ, M.; KELLNER, U.; LEO-KOTTLER, B.; AUBURGER, G.; BHATTACHARYA, S. S.; WISSINGER, B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. **Nature genetics**, v. 26, n. 2, p. 211–215, 2000.

-BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2010.

BLEAZARD, W.; MCCAFFERY, J. M.; KING, E. J.; BALE, S.; MOZDY, A.; TIEU, Q.; NUNNARI, J.; SHAW, J. M. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. v. 1, n. September, 1999.

-BLIEK, A. M. Van Der. Functional diversity in the dynamin family. v. 8924, n. 98, p. 96–102, 1999.

-CECCONI, S.; MAURO, A.; CELLINI, V.; PATACCHIOLA, F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 809–817, 2012.

-CHAN, D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 79–99, 2006.

-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, 2005.

-CHEN, H.; DETMER, S. A.; EWALD, A. J.; GRIFFIN, E. E.; FRASER, S. E.; CHAN, D. C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 189–200, 2003.

-CHEN, H.; VERMULST, M.; WANG, Y. E.; CHOMYN, A.; PROLLA, T. A.; MCCAFFERY, J. M.; CHAN, D. C. 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, K. H.; DASGUPTA, A.; DING, J.; INDIG, F. E.; GHOSH, P.; L. LONGO, D. Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. **FASEB Journal**, v. 28, n. 1, p. 382–394, 2014.

-CHEN, K. H.; GUO, X.; MA, D.; GUO, Y.; LI, Q.; YANG, D.; LI, P.; QIU, X.; WEN, S.; XIAO, R. P.; TANG, J. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. **Nature Cell Biology**, 2004.

-CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; WELLS, D.; POULTON, J. Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development. **Mitochondrion**, 2011.

-CIPOLAT, S.; DE BRITO, O. M.; DAL ZILIO, B.; SCORRANO, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 15927–15932, 2004.

-CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, 2018.

-COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. v. 808, n. February, p. 799–808, 2013.

-DANINO, D.; HINSHAW, J. E. Dynamin family of mechanoenzymes. p. 454–460, 2001.

-DAVIES, V. J.; HOLLINS, A. J.; PIECHOTA, M. J.; YIP, W.; DAVIES, J. R.; WHITE, K. E.; NICOLS, P. P.; BOULTON, M. E.; VOTRUBA, M. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 11, p. 1307–1318, 2007.

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

-DE BRITO, O. M.; SCORRANO, L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras. **Mitochondrion**, v. 9, n. 3, p. 222–226, 2009.

-DE VRIES, W. N.; BINNS, L. T.; FANCHER, K. S.; DEAN, J.; MOORE, R.;

KEMLER, R.; KNOWLES, B. B. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. **Genesis (New York, N.Y. : 2000)**, v. 26, n. 2, p. 110–2, fev. 2000.

-DEBEY, P.; SZÖLLÖSI, M. S.; SZÖLLÖSI, D.; VAUTIER, D.; GIROUSSE, A.; BESOMBES, D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, n. 1, p. 59–74, 1993.

-DEMCHUK, M.; HUANG, H.; WHITE, C.; KIPP, J. L. Retinoic Acid Regulates Calcium Signaling to Promote Mouse Ovarian Granulosa Cell Proliferation. **Biology of reproduction**, 2016.

-DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 4, p. 405–414, 2007.

-DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2006. .

-DUMOLLARD, R.; HAMMAR, K.; PORTERFIELD, M.; SMITH, P. J.; CIBERT, C.; ROUVIÈRE, C.; SARDET, C. Mitochondrial respiration and Ca<sup>2+</sup> waves are linked during fertilization and meiosis completion. **Development (Cambridge, England)**, v. 130, n. 4, p. 683–692, 2003.

-EL-HAYEK, S.; CLARKE, H. J. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis. **Biol Reprod**, v. 93, n. 2, p. 47, 2015.

-EL-HAYEK, S.; DEMEESTERE, I.; CLARKE, H. J. Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 47, p. 16778–83, 2014.

-EL-HAYEK, S.; YANG, Q.; ABBASSI, L.; FITZHARRIS, G.; CLARKE, H. J. Mammalian Oocytes Locally Remodel Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. **Current Biology**, 2018.

-FAELBER, K. **Oligomerization of Dynamin Superfamily Proteins in Health**. [s.l.: s.n.]v. 117

-FAIR, T. Mammalian oocyte development: Checkpoints for competence. **Reproduction, Fertility and Development**, 2010. .

- GRIPARIC, L.; VAN DER WEL, N. N.; OROZCO, I. J.; PETERS, P. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18792–18798, 2004.
- HOPPINS, S.; LACKNER, L.; NUNNARI, J. The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. 2007.
- INGERMAN, E.; PERKINS, E. M.; MARINO, M.; MEARS, J. A.; MCCAFFERY, J. M.; HINSHAW, J. E.; NUNNARI, J. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 170, n. 7, p. 1021–1027, 2005.
- 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. Pt 26, p. 6535–6546, 2004.
- ISHIHARA, N.; NOMURA, M.; JOFUKU, A.; KATO, H.; SUZUKI, S. O.; MASUDA, K.; OTERA, H.; NAKANISHI, Y.; NONAKA, I.; GOTO, Y.-I.; TAGUCHI, N.; MORINAGA, H.; MAEDA, M.; TAKAYANAGI, R.; YOKOTA, S.; MIHARA, K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. **Nature cell biology**, v. 11, n. 8, p. 958–966, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb1907>>.
- JANSEN, R. P. S.; DE BOER, K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. In: Molecular and Cellular Endocrinology, 1–2, **Anais...**1998.
- JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, 1999.
- KIPP, J. L.; GOLEBIOWSKI, A.; RODRIGUEZ, G.; DEMCZUK, M.; KILEN, S. M.; MAYO, K. E. Gene expression profiling reveals Cyp26b1 to be an activin regulated gene involved in ovarian granulosa cell proliferation. **Endocrinology**, 2011.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191–206, 2006.
- KUKAT, C. mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. v. 23, n. 9, p. 457–463, 2013.
- LABBÉ, K.; MURLEY, A.; NUNNARI, J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 357–91,

2014.

-LABROUSSE, a M.; ZAPPATERRA, M. D.; RUBE, D. a; VAN DER BLIEK, a M. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. **Molecular cell**, v. 4, n. 5, p. 815–826, 1999.

-LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. **MTOR signaling in growth control and disease***Cell*, 2012. .

-MA, L.; CHANG, Y.; YU, L.; HE, W.; LIU, Y. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via PI3K/Akt signaling in breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 10, n. 6, p. 3816–3822, 2015.

-MACABELLI, C. H.; FERREIRA, R. M.; GIMENES, L. U.; DE CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; SANGALLI, J. R.; SMITH, L. C.; BARUSELLI, P. S.; MEIRELLES, F. V.; CHIARATTI, M. R. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

-MACHADO, T. S.; MACABELLI, C. H.; SANGALLI, J. R.; RODRIGUES, T. B.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; CHIARATTI, M. R. Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL / 6 and NZB / BINJ Strains. **PLoS ONE**, 2015.

-MAKKER, A.; GOEL, M. M.; MAHDI, A. A. **PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: An update***Journal of Molecular Endocrinology*, 2014. .

-MATTSON, B. A.; ALBERTINI, D. F. Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 4, p. 374–383, 1990.

-MATZUK, M. M.; BURNS, K. H. Genetics of Mammalian Reproduction: Modeling the End of the Germline. **Annual Review of Physiology**, 2012.

-MAY-PANLOUP, P.; CHRETIEN, M. F.; MALTHIERY, Y.; REYNIER, P. **Mitochondrial DNA in the Oocyte and the Developing Embryo***Current Topics in Developmental Biology*, 2007. .

-MOTTA, P. M.; NOTTOLA, S. a; MAKABE, S.; HEYN, R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15 Suppl 2, p. 129–147, 2000.

- NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K.; BEHRINGER, R. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- NAON, D.; SCORRANO, L. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2184–2194, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** [s.l.: s.n.]
- OLICHON, A.; EMORINE, L. J.; DESCOINS, E.; PELLOQUIN, L.; BRICHESE, L.; GAS, N.; GUILLOU, E.; DELETTRE, C.; VALETTE, A.; HAMEL, C. P.; DUCOMMUN, B.; LENAERS, G.; BELENGUER, P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. **FEBS Letters**, v. 523, n. 1–3, p. 171–176, 2002.
- OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.
- PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit-Ligand/Stem Cell Factor Induces Primordial Follicle Development and Initiates Folliculogenesis 1. **Endocrinology**, 1999.
- PATTEN, D. A.; WONG, J.; KHACHO, M.; SOUBANNIER, V.; MAILLOUX, R. J.; PILON-LAROSE, K.; MACLAURIN, J. G.; PARK, D. S.; MCBRIDE, H. M.; TRINKLE-MULCAHY, L.; HARPER, M.-E.; GERMAIN, M.; SLACK, R. S. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. **The EMBO Journal**, 2014.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. In: Molecular and Cellular Endocrinology, 1–2, **Anais...**1998.
- PRAEFCKE, G. J. K.; MCMAHON, H. T. THE DYNAMIN SUPERFAMILY: UNIVERSAL MEMBRANE TUBULATION AND FISSION MOLECULES? v. 5, n. February, 2004.
- REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M.-F.; MORGAN, C. J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 5, p. 425–429, 2001.
- ROJO, M.; LEGROS, F.; CHATEAU, D.; LOMBÈS, A. Membrane topology and

mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt 8, p. 1663–1674, 2002.

-SCHON, E. a; KIM, S. H.; FERREIRA, J. C.; MAGALHÃES, P.; GRACE, M.; WARBURTON, D.; GROSS, S. J. Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15 Suppl 2, p. 160–172, 2000.

-SCHREPFER, E.; SCORRANO, L. **Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism****Molecular Cell**, 2016. .

-SESAKI, H.; JENSEN, R. E. Mitochondrial Shape. v. 147, n. 4, p. 699–706, 1999.

-SHI, H.; SEGALOFF, D. L. A role for increased lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) gene transcription in the follitropin-stimulated induction of the LHR in granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 6, p. 734–744, 1995.

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

-SU, Y.; PH, D.; SUGIURA, K.; PH, D.; EPPIG, J. J.; PH, D. Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function: Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism. 2009.

-THOMAS, F. H.; ISMAIL, R. S.; JIANG, J.-Y.; VANDERHYDEN, B. C. Kit ligand 2 promotes murine oocyte growth in vitro. **Biology of reproduction**, 2008.

-UDAGAWA, O.; ISHIHARA, T.; MAEDA, M.; MATSUNAGA, Y.; TSUKAMOTO, S.; KAWANO, N.; MIYADO, K.; SHITARA, H.; YOKOTA, S.; NOMURA, M.; MIHARA, K.; MIZUSHIMA, N.; ISHIHARA, N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. **Current Biology**, v. 24, n. 20, p. 2451–2458, 2014.

-VAN BLERKOM, J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: Engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence **Reproduction**, 2004.

-VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 797–813, 2010.

-WAI, T.; AO, A.; ZHANG, X.; CYR, D.; DUFORT, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility. **Biology of**



**Reproduction**, 2010.

-WAKABAYASHI, J.; ZHANG, Z.; WAKABAYASHI, N.; TAMURA, Y.; FUKAYA, M.; KENSLER, T. W.; IJIMA, M.; SESAKI, H. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. **Journal of Cell Biology**, v. 186, n. 6, p. 805–816, 2009.

-WAKAI, T.; HARADA, Y.; MIYADO, K.; KONO, T. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 1090–1100, 2014.

-WALLACE, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases , Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. 2005.

-WATERHAM, H. R.; KOSTER, J.; VAN ROERMUND, C. W. T.; MOOYER, P. A. W.; WANDERS, R. J. A. A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 17, p. 1736–1741, 2015.

-WATSON, J. **Watson J.D., et al. Molecular Biology of the Gene (5th edition, 2004)b.pdfBioScience**, 2004.

-WU, X.; CHEN, L.; BROWN, C. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Interrelationship of Growth Differentiation Factor 9 and Inhibin in Early Folliculogenesis and Ovarian Tumorigenesis in Mice. **Molecular Endocrinology**, 2004.

-XU, K.; CHEN, G.; LI, X.; WU, X.; CHANG, Z.; XU, J.; ZHU, Y.; YIN, P.; LIANG, X.; DONG, L. MFN2 suppresses cancer progression through inhibition of mTORC2/Akt signaling. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 41718, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep41718>>.

-YANG, Q.; ALLARD, P.; HUANG, M.; ZHANG, W.; CLARKE, H. J. Proteasomal Activity Is Required to Initiate and to Sustain Translational Activation of Messenger RNA Encoding the Stem-Loop-Binding Protein During Meiotic Maturation in Mice1. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 123–131, 2010.

-YOON, Y.; PITTS, K. R.; MCNIVEN, M. a. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 9, p. 2894–2905, 2001.

-YU, Y.; DUMOLLARD, R.; ROSSBACH, A.; LAI, F. A.; SWANN, K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 672–680, 2010.

-ZELEZNIK, A. J.; MIDGLEY, A. R.; REICHERT, L. E. Granulosa cell maturation in

the rat: Increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. **Endocrinology**, 1974.

-ZENG, H.-T.; RICHANI, D.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; REN, Z.; SMITZ, J. E. J.; STOKES, Y.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 2, p. 47, 2014.

-ZHANG, G.-E.; JIN, H.-L.; LIN, X.-K.; CHEN, C.; LIU, X.-S.; ZHANG, Q.; YU, J.-R. Anti-tumor effects of mfn2 in gastric cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 14, p. 13005–21, 2013.

-ZORZANO, A.; HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I.; SEBASTIÁN, D.; MUÑOZ, J. P. Mitofusin 2 as a Driver That Controls Energy Metabolism and Insulin Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 12, p. 1020–1031, 2015.

-ZUCCOTTI, M.; PONCE, R. H.; BOIANI, M.; GUIZZARDI, S.; GOVONI, P.; SCANDROGLIO, R.; GARAGNA, S.; REDI, C. A. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. **Zygote**, v. 10, n. 1, p. 73–78, 2002.