

MATEUS PRIOLO GREJO

**Impacto da deleção oócito-específica de *Rad51*
sobre o DNA mitocondrial e a divisão meiótica
em 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 Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

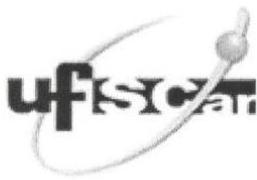
Departamento:
Genética e Evolução

Área de concentração:
Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:
Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Mateus Priolo Grejo, realizada em 28/02/2020:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
UFSCar

Prof. Dr. Ricardo Perecin Nociti
USP

Prof. Dr. Mateus José Sudano
USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti pelo apoio e orientação.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, pelo curso de mestrado oferecido.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida, processo 130496/2018-9.

À FAPESP pelo fomento, processo 2017/04372-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

À Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto pelas várias contribuições com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Pierre-Olivier Frappart, da Universität Ulm – Alemanha, e ao Prof. Dr. Rodrigo Martins, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo desenvolvimento e fornecimento da linhagem *Rad51^{fl}*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da foliculogênese.....	14
Figura 2 – Modelo para herança mitocondrial.....	16
Figura 3 – Respostas celulares a quebras de DNA.....	17
Figura 4 – Reparo por junção de extremidades não homólogas.....	18
Figura 5 – Reparo por recombinação homóloga.....	20
Figura 6 – Reparo de quebras na forquilha de replicação de DNA.....	21
Figura 7 – Acasalamento das matrizes experimentais.....	26
Figura 8 – Acasalamento: testes de fertilidade.....	27
Figura 9 – Genotipagem para <i>Rad51^{fl}</i> e <i>Atrip^{fl}</i>	36
Figura 10 – Genotipagem para <i>Nnt</i> e <i>Pax6-Cre</i>	36
Figura 11 – Genotipagem matrizes.....	37
Figura 12 – Genotipagem <i>Zp3-Cre</i>	38
Figura 13 – Genotipagem excisado <i>Rad51</i>	39
Figura 14 – Excisão do alelo <i>Rad51^{fl}</i>	39
Figura 15 – Expressão de <i>Rad51</i> em oócitos e cumulus.....	40
Figura 16 – Western blot de oócitos.....	41
Figura 17 – Expressão gênica – oócitos.....	42
Figura 18 – Expressão gênica – cumulus.....	44
Figura 19 – Conformação da cromatina – oócitos.....	45
Figura 20 – Número de oócitos ovulados.....	46
Figura 21 – Fusos meióticos.....	47
Figura 22 – Cópias de mtDNA – oócitos ovulados.....	48
Figura 23 – Cópias de mtDNA – oócitos imaturos.....	49

Figura 24 – Cópias de mtDNA – fígado.....	50
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers empregados para genotipagens.....	28
Tabela 2 – Ciclos de PCR das reações de genotipagens.....	28
Tabela 3 – Primers para mensuração de mtDNA.....	30
Tabela 4 – Primers empregados para análises de expressão gênica.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato (do inglês “adenosine triphosphate”)
cDNA	DNA complementar
cKO	nocaute condicional (do inglês “conditional knockout”)
COC	complexo oócito – cumulus
DSBs	quebras de dupla fita de DNA (do inglês “double strand breaks”)
eCG	gonadotrofina coriônica equína
floxed/ fl/ loxP	sequências de DNA flanqueadas
FSH	hormônio folículo estimulante (do inglês “follicle stimulating hormone”)
FSHr	receptor de hormônio folículo estimulante (do inglês “follicle stimulating hormone receptor”)
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina (do inglês “gonadotropin releasing hormone”)
GV	vesícula germinativa (do inglês “germinal vesicle”)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HR	recombinação homóloga (do inglês “homologous recombination”)
LH	hormônio luteinizante (do inglês “luteinizing hormone”)
mRNAs	RNAs mensageiros
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
NHEJ	junção de extremidades não homólogas (do inglês “non homologous end joining”)
NSN	“non surrounded nucleolus”
PB1	primeiro corpúsculo polar (do inglês “polar body 1”)

PBS	tampão fosfato salino (do inglês “phosphate buffered saline”)
pDNA	DNA plasmidial
PGCs	células germinativas primordiais (do inglês “primordial germ cells”)
RNAi	RNA de interferência
RNAseq	sequenciamento de RNA
ROS	espécies reativas de oxigênio (do inglês “reactive oxygen species”)
rRNAs	RNAs ribossomais
SN	“surrounded nucleolus”
tRNAs	RNAs transportadores
Zp3	glicoproteína 3 da zona pelúcida (do inglês “Zona pellucida glycoprotein 3”).

Obs: Ao longo do texto, nomenclaturas para proteínas foram escritas com letras maiúsculas (ex, RAD51) e para genes e transcritos foram escritas com apenas a primeira letra maiúscula e em “*itálico*” (ex, *Rad51*).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	4
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. OOGÊNESE E FOLÍCULOGÊNESE	11
2.2. MITOCÔNDRIAS NO OÓCITO	15
2.3. REPARO DE QUEBRAS DE FITA-DUPLA NO DNA	16
2.4. REPARO DE DSBs em oócitos.....	21
2.5. REPARO DO mtDNA	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. OBJETIVOS GERAIS	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. HIPÓTESES	24
5. MATERIAIS & MÉTODOS	24
5.1. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	24
5.2. ACASALAMENTOS.....	25
5.3. GENOTIPAGENS	27
5.4. COLETA DE OÓCITOS IMATUROS.....	29
5.5. COLETA DE OÓCITOS OVULADOS.....	29
5.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA	30
5.7. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR	32
5.8. WESTERN BLOT	34

5.9. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	34
5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
6. RESULTADOS	35
6.1. ACASALAMENTOS E GENOTIPAGENS	35
6.2. VALIDAÇÃO DO MODELO ANIMAL.....	40
6.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	41
6.4. MICROSCOPIA CONFOCAL – NUCLÉOLO	44
6.5. OVULAÇÃO – EXTRUSÃO DO PB1 E ORGANIZAÇÃO DA PLACA METAFÁSICA.....	46
6.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA.....	48
7. DISCUSSÕES.....	50
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

A RAD51 é uma proteína de organismos eucariotos, com função central na via de reparo de DNA por recombinação homóloga. Sua função no núcleo de células somáticas é bem estabelecida, sendo necessária para a manutenção do ciclo celular. A RAD51 também é importada para a mitocôndria, onde desempenha importante papel na replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) sob condição de estresse replicativo e oxidativo. Na linhagem germinativa, a RAD51 é essencial para a embriogênese inicial, porém, pouco se sabe sobre a sua função no oócito. Considerando a importância da recombinação homóloga durante a meiose, nós elaboramos a hipótese de que a RAD51 é essencial para a formação do oócito. No tocante a mitocôndria, uma vez que o mtDNA é intensamente replicado durante o crescimento do oócito é possível que a RAD51 também seja determinante para essa organela no oócito. Neste sentido, no presente trabalho, utilizamos um modelo animal com deficiência oócito-específica de RAD51 para investigar o papel desta recombinase durante a oogênese. Como resultado, encontramos que a RAD51 é dispensável para o crescimento e ovulação do oócito. Essa conclusão foi amparada pela ovulação de número normal de oócitos nocautes (*Rad51^{-/-}*), os quais apresentaram organização do fuso meiótico comparável ao de oócitos selvagens. Ademais, não foi observado impacto da deficiência de RAD51 sobre o número de cópias de mtDNA no oócito. Apesar disso, a análise a nível transcricional e proteico confirmou a deleção oócito-específica de RAD51. Como conclusão, podemos afirmar que a RAD51 é dispensável durante o desenvolvimento final do oócito, de folículo primário até a ovulação. A sua deficiência não resulta em impacto evidente sobre a progressão meiótica ou a estabilidade do mtDNA.

Palavras-chave: RAD51, oócito, meiose, mitocôndria, mtDNA.

ABSTRACT

RAD51 is a protein of eukaryotic organisms, with a central role in the DNA repair pathway by homologous recombination. Its function in the nucleus of somatic cells is well established, being necessary for the maintenance of the cell cycle. RAD51 is also imported into the mitochondria, where it plays an important role in the replication of mitochondrial DNA (mtDNA) under conditions of replicative and oxidative stress. RAD51 is essential for initial embryogenesis, however, little is known about its function in the oocyte. Considering the importance of homologous recombination during meiosis, we hypothesized that RAD51 is essential for the oocyte development. Regarding the mitochondria, since mtDNA is intensely replicated during oocyte growth, it is possible that RAD51 is also determinant for this organelle in the oocyte. In this sense, in the present study, we used an animal model with oocyte-specific deficiency of RAD51 to investigate the role of this recombinase during oogenesis. As a result, we found that RAD51 is expendable for oocyte growth and ovulation. This conclusion was supported by the ovulation of a normal amount of knockout oocytes (*Rad51^{-/-}*), which presented an organization of the meiotic spindle comparable to that of wild type oocytes. Furthermore, there was no impact of RAD51 deficiency on the number of mtDNA copies in the oocyte. Despite this, analysis at the transcriptional and protein level confirmed the oocyte-specific deletion of RAD51. As a conclusion, we can state that RAD51 is dispensable during the final development of the oocyte, from the primary follicle to ovulation. Its deficiency alone does not result in any evident impact on meiotic progression or mtDNA stability.

Keywords: RAD51, oocyte, meiosis, mitochondria, mtDNA.

1. INTRODUÇÃO

Danos no DNA são as injúrias mais comuns que desafiam a sobrevivência das células, e uma das principais causas do envelhecimento. O acúmulo de danos em oócitos mostra-se a causa do declínio/ perda da capacidade reprodutiva feminina com o envelhecimento (TITUS; STOBZKI; OKTAY, 2015); o mecanismo molecular por trás desse fato ainda não é completamente entendido, mas é associado ao comprometimento do reparo de DNA com a idade (TITUS et al., 2013). Além do genoma nuclear (nDNA), o genoma mitocondrial (mtDNA) é afetado por danos que, dependendo da proporção, podem comprometer a funcionalidade da mitocôndria (DRIGGERS; LEDOUX; WILSON, 1993).

Uma grande variedade de doenças em humanos, principalmente degenerativas, são causadas por disfunções mitocondriais, comumente envolvendo tecidos de alta demanda energética como o coração, o músculo e os sistemas renais e endócrinos (MEYERS; BASHA; KOENIG, 2013). A frequência de doenças mitocondriais é relativamente alta, acometendo ~1 em cada 5000 pessoas (FAN et al., 2011). Essas doenças podem ser determinadas por mutações no próprio mtDNA, o qual é transmitido exclusivamente pelo oócito de forma não mendeliana; danos e mutações no mtDNA muitas vezes são consequências de problemas na expressão de genes nucleares associados a manutenção do genoma mitocondrial (WALLACE, 1999), um forte candidato a essa função é o gene *Rad51*, o qual é foco deste trabalho.

Comparado ao nDNA, a exposição do mtDNA a um ambiente altamente oxidativo como o da matriz mitocondrial torna-o propenso a lesões estruturais (YAKES; VAN HOUTEN, 1997). Assim, a mitocôndria faz uso de pelo menos parte da maquinaria de reparo nuclear para manter a estabilidade do mtDNA (CHEN, 2013). Em especial, estão presentes na mitocôndria componentes da maquinaria de reparo de quebras de dupla fita de DNA (DSBs), como a RAD51, RAD51C, XRCC3 e MRE11 (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010)(DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011). Interessantemente, a presença da RAD51 na mitocôndria tem sido associada a replicação do mtDNA sob condição de estresse (SAGE; KNIGHT, 2013). Ainda, a depleção de RAD51 durante a maturação *in vitro* oocitária leva a disfunção mitocondrial, sugerindo um importante papel desta recombinase em resguardar a função da mitocôndria no oócito (KIM et al., 2016).

Trabalhos anteriores forneceram evidências de que a RAD51 é essencial durante a embriogênese inicial em murinos; a sua deleção resulta em bloqueio ainda durante a pré-implantação, sendo relatado queda da proliferação celular e danos cromossômicos, seguidos de morte celular por apoptose (TSUZUKI et al., 1996)(LIM; HASTY, 1996). Assim, para estudo da sua função em tecidos e/ou organelas específicas, faz-se necessário a sua deleção tecido/célula-específica. Portanto, no presente trabalho realizamos a deleção oócito-específica de RAD51 baseado no sistema *cre-lox* e expressão de Cre-recombinase (CRE) dirigida pelo promotor *Zp3*, expresso em oócitos a partir da transição de folículo primário para folículo secundário (KNOWLES et al., 2016).

Com isso, o nocaute foi induzido durante o crescimento oocitário, a partir de folículos primários/ secundários. Uma das vantagens desse período é a intensa replicação do mtDNA no oócito, possibilitando estudar um possível impacto da deficiência de RAD51 sobre a estabilidade deste genoma (MAHROUS; YANG; CLARKE, 2012). Também investigamos neste trabalho o impacto da deficiência de RAD51 sobre a organização do fuso meiótico e a expressão de outros genes envolvidos com o reparo de DSBs em oócitos murinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OOGÊNESE E FOLÍCULOGÊNESE

Os gametas de mamíferos são derivados das células germinativas primordiais (PGCs), células diploides que se formam no embrião de camundongo por volta do dia 7,5 (E7,5) após implantação (GINSBURG; SNOW; MCLAREN, 1990). As PGCs migram para as gônadas em desenvolvimento e, no organismo feminino, dão origem às oogônias por proliferação mitótica, povoando o ovário (PEPLING, 2006). Após a proliferação por mitose, as oogônias entram em meiose e passam a serem denominadas oócitos primários (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009). Estes são então envolvidos por uma camada única de células somáticas de morfologia achatada, originadas do epitélio da gônada rudimentar, denominadas pré-granulosa (PICTON, 2001). A esta estrutura composta por oócito primário e células da pré-granulosa dá-

se o nome de folículo primordial (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012), os folículos primordiais presentes no ovário ao nascimento abrigam a população total de oócitos que a fêmea irá usufruir durante toda a sua vida reprodutiva, denominado reserva ovariana (KEZELE; NILSSON; SKINNER, 2002).

Uma vez que os folículos primordiais se estabelecem, a primeira fase da divisão meiótica é interrompida no estágio de diplóteno da prófase I (BORUM, 1967). Nesta fase, os cromossomos descondensam-se e são envolvidos pela membrana nuclear, conhecida como vesícula germinativa (GV) (DE LA FUENTE, 2006). Em humanos, o oócito pode permanecer neste estágio de desenvolvimento por até 50 anos, ou até que um sinal desencadeie o seu crescimento e maturação (SMITZ JE, 2002). O desenvolvimento pós-natal dos oócitos compreende duas fases: um longo período de crescimento do oócito dentro do folículo e um breve período de maturação meiótica que culmina com a sua ovulação (WASSARMAN; JOSEFOWICZ, 1978).

Em murinos, a ativação da foliculogênese se dá ao nascimento. Com isso, inicia-se o crescimento do oócito, marcado pela diferenciação das células da pré-granulosa em células da granulosa (LIU et al., 2014). As células da pré-granulosa desempenham papel chave na ativação da foliculogênese através da expressão de KIT *ligand* (KITL) (SAATCIOGLU; CUEVAS; CASTRILLON, 2016). Este, por sua vez, se liga ao receptor KIT na membrana do oócito e ativa vias de sinalização que desencadeiam o crescimento oocitário (CHOI; RAJKOVIC, 2006). O oócito também secreta fatores como GDF9, BMP15 e FGF8B, que regulam a proliferação e diferenciação das células da granulosa (CLARKE, 2018). O crescimento do oócito requer de 3 a 4 meses em humanos e ~3 semanas em camundongos (CLARKE, 2018). Durante este período o volume do oócito aumenta mais de 100 vezes, refletindo o acúmulo de RNAs mensageiros (mRNAs), proteínas e organelas (principalmente mitocôndrias) (SAATCIOGLU; CUEVAS; CASTRILLON, 2016); componentes essenciais para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

A diferenciação das células da pré-granulosa em granulosa e início do crescimento oocitário marcam a transição para folículo primário (BINELLI; MURPHY, 2010). Nos estágios subsequentes, o oócito continua a crescer e as células da granulosa se replicam rapidamente (DA SILVA-BUTTKUS et al., 2008). A passagem para folículo secundário caracteriza-se pela presença de múltiplas camadas de células da granulosa (WASSARMAN; JOSEFOWICZ, 1978). Também, durante esse período

o oócito passa a secretar um conjunto de glicoproteínas (e.g., ZP1, ZP2 e ZP3) que formarão ao redor do gameta uma camada protetora denominada zona pelúcida (AERTS; BOLS, 2010).

A fase seguinte da foliculogênese caracteriza-se por um aumento significativo no tamanho do folículo, como resultado da formação de um antro entre as várias camadas de células da granulosa (WIGGLESWORTH et al., 2015). Com a formação do antro, as células da granulosa expressam níveis elevados de receptores (FSHr) para o hormônio folículo estimulante (FSH), fazendo com que o desenvolvimento folicular seja fortemente influenciado pelas concentrações de FSH (CHIARATTI et al., 2018). Além disso, o antro subdivide as células da granulosa em duas populações com características funcionais distintas: as células murais da granulosa e as células do cumulus (WIGGLESWORTH et al., 2015). Enquanto as células murais da granulosa desempenham um papel central na síntese de hormônios e de vários outros ligantes, as células do cumulus interagem física e metabolicamente com o oócito para dar suporte ao seu desenvolvimento (CLARKE, 2018). Ao conjunto oócito mais células do cumulus dá-se o nome de complexo cumulus-oócito (COC).

Com o crescimento do antro ocorre a transição de folículo antral para folículo pré-ovulatório. Neste estágio, as células foliculares sintetizam e secretam estradiol e inibina, além de expressarem receptores para o hormônio luteinizante (LH) (CLARKE, 2018). O estradiol e a inibina (INHA, INHBA e INHBB), secretados pelas células da granulosa, atuam na hipófise para diminuir gradualmente a liberação de FSH (CHIARATTI et al., 2018). 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 pela hipófise. Isso leva à progressão para a fase pré-ovulatória, caracterizada pela expansão folicular e bloqueio da proliferação de células da granulosa (CONTI et al., 2012).

A última fase do desenvolvimento do oócito é a maturação, desencadeada com a liberação de LH. Esta ocorre em folículos pré-ovulatórios e caracteriza-se pela preparação final do oócito para a ovulação e fecundação (HOLT; LANE; JONES, 2013). Durante a maturação, há retomada da divisão meiótica que estava bloqueada em prófase I. Esta caracteriza-se pelo rompimento da GV e extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB1) contendo 50% do conjunto cromossômico (homólogos) (COTICCHIO et al., 2014). A meiose progride durante a maturação até o estágio de metáfase II, quando é novamente bloqueada (Figura 1). Em mamíferos, a meiose

somente é concluída com a fecundação (LI; ALBERTINI, 2013). A maturação nuclear é uma fase bastante crítica durante o desenvolvimento do oócito pois requer o correto pareamento e segregação dos cromossomos, evitando a ocorrência de aneuploidias (BARRETT; ALBERTINI, 2010). Estes processos requerem grande aporte energético, o qual é fornecido pelas mitocôndrias (JOHNSON et al., 2007). Durante a maturação, as mitocôndrias e outras organelas citoplasmáticas apresentam-se bastante dinâmicas, agregando-se em locais específicos do oócito, o que, juntamente com outros eventos, caracteriza a maturação citoplasmática (YU *et al.*, 2010). Com a conclusão da maturação nuclear e citoplasmática, o oócito é ovulado e está pronto para ser fecundado.

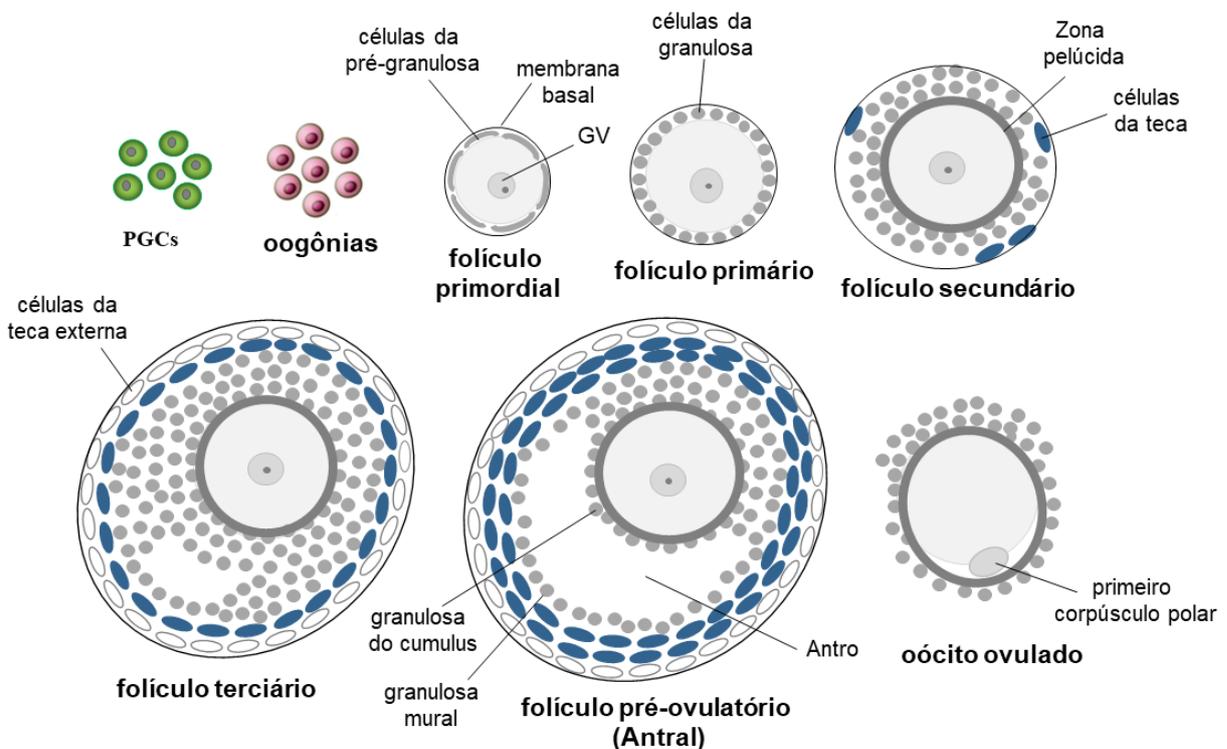


Figura 1: Representação simplificada da ovogênese e foliculogênese em mamíferos.

As PGCs são diferenciadas durante o desenvolvimento embrionário e dão origem às oogônias, nas gônadas em desenvolvimento. As oogônias então entram em meiose e originam os oócitos (prófase I), estes são envolvidos pela pré-granulosa e membrana basal, formando os folículos primordiais, que compõe a reserva folicular ovariana, e só serão ativados após a chegada da puberdade. A foliculogênese tem início com a ativação de grupos de folículos primordiais, as células da pré-granulosa se diferenciam em células da granulosa, caracterizando o foliculo primário, e o crescimento do oócito é ativado. Na transição de foliculo primário para foliculo secundário as células da granulosa se proliferam, o oócito está em crescimento e secreta a zona pelúcida, e são diferenciadas células da teca. Em foliculo terciário, as células da teca circundam o foliculo e estabelecem a vascularização e controle endócrino do foliculo. Então o foliculo cresce até estágio pré-ovulatório. A ativação da ovulação se dá por estímulo endócrino, iniciando a maturação oocitária com a retomada da meiose, ocorre o rompimento da GV e extrusão do PB1, e a meiose progride até a metáfase II. Os oócitos ovulados são expelidos do foliculo e continuam envolvidos pelas células da granulosa do cumulus, e seguem para o oviduto, a meiose só será concluída se houver a fecundação.

Fonte: elaborado pelo autor.

2.2. MITOCÔNDRIAS NO OÓCITO

Mitocôndrias desempenham papel fundamental no metabolismo energético em células eucarióticas. Além da sua função na produção de ATP, as mitocôndrias desempenham funções centrais na sinalização redox, homeostase de cálcio, sinalização apoptótica, entre outros (FIGUEIRA *et al.*, 2013). Uma característica particular da biologia mitocondrial é que essas organelas contêm um genoma próprio (mtDNA), independente do genoma nuclear. Em humanos, o mtDNA contém 16569 pares de bases e codifica 13 proteínas, 2 rRNAs e 22 tRNAs (STEWART; CHINNERY, 2015). Todos os 13 polipeptídeos codificados pelo mtDNA compõem, junto com polipeptídeos codificados pelo nDNA, os complexos I, III, IV e V da cadeia transportadora de elétrons (WALLACE, 1999).

Devido à fosforilação oxidativa, a mitocôndria constitui um dos principais sítios de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula, o que torna o mtDNA bastante propenso a danos oxidativos e ao surgimento de mutações (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Uma vez que o genoma mitocondrial quase não contém regiões intergênicas e é destituído de íntrons, mutações no mtDNA têm maiores chances de afetar a codificação proteica se comparado ao nDNA (WALLACE; CHALKIA, 2013).

Dentre todas as células de mamíferos, o oócito é a célula que apresenta maior quantidade de mitocôndrias e mtDNA (WANG *et al.*, 2019). Durante o crescimento do oócito, o número de moléculas de mtDNA aumenta de poucas dezenas em folículos primordiais para cerca de duzentos-trezentos mil em oócitos maduros (Figura 2) (STEWART; CHINNERY, 2015). Tendo em vista relatos sobre a importância da RAD51 na replicação do mtDNA (SAGE; KNIGHT, 2013), é de se esperar que esta desempenhe importante papel durante a replicação do mtDNA no oócito. A interferência por RNA (RNAi) sobre a expressão de RAD51 no oócito resulta em evidente disfunção mitocondrial e bloqueio da progressão meiótica (KIM *et al.*, 2016). Isso possivelmente é explicado pela grande demanda energética durante a maturação oocitária; as mitocôndrias tornam-se bioenergeticamente mais ativas e agrupam-se em regiões específicas com alta demanda energética como em torno do fuso meiótico (BERRIDGE; NEUZIL, 2017). Como consequência, anormalidades no fuso meiótico e

aneuploidias em embriões são frequentemente associadas a disfunção mitocondrial em oócitos (ZHANG *et al.*, 2014).

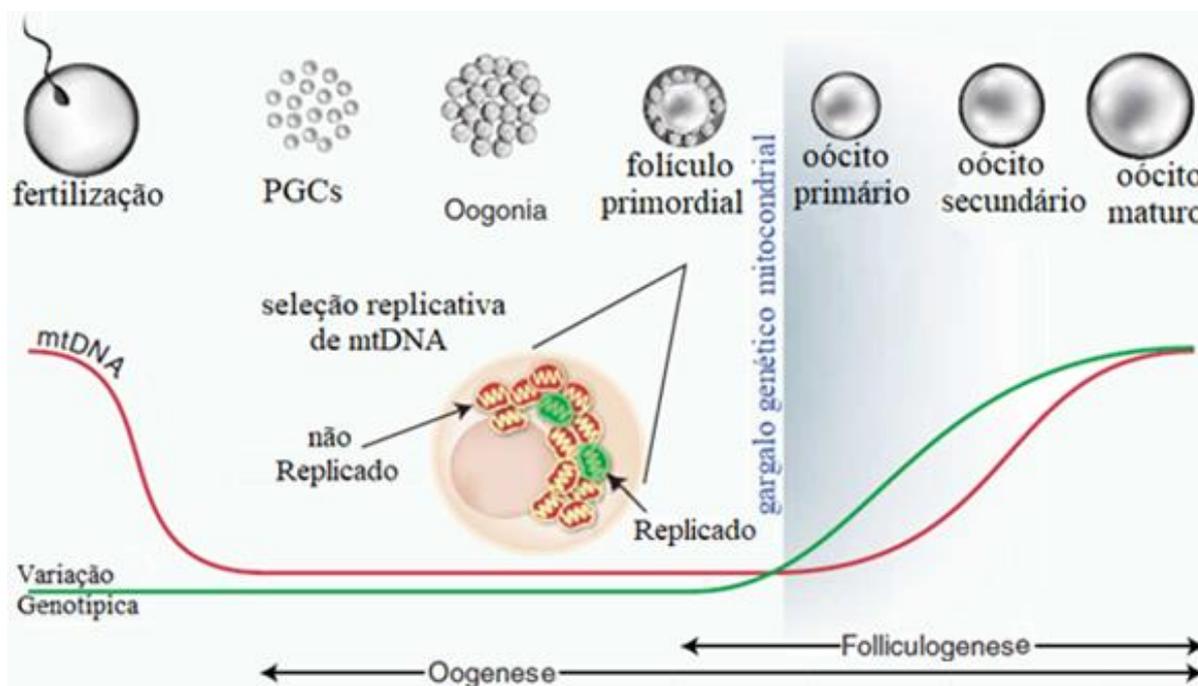


Figura 2: Modelo para a transmissão do mtDNA na linhagem germinativa feminina.

As mitocôndrias de mamíferos são herdadas pelo oócito, após a fertilização, as mitocôndrias são segregadas na embriogênese. Durante a posterior oogênese, até o estabelecimento do folículo primordial, o número de mitocôndrias e mtDNA se mantém praticamente constante, então na folliculogênese, é ativada a replicação intensa de mtDNA.

Fonte: Adaptado de (WAI *et al.*, 2008).

2.3. REPARO DE QUEBRAS DE FITA-DUPLA NO DNA

Os genomas tanto nuclear quanto mitocondrial são constantemente expostos a situações e agentes com potencial para causarem DSBs (NEGRITTO, 2010). Entre estes, destacam-se fatores endógenos como ROS e erros replicativos (HARTLERODE; SCULLY, 2009). Se não corrigidas, as DSBs podem levar a drásticas consequências para a célula, como a interrupção do ciclo celular, bloqueio da replicação e transcrição, incorreta segregação cromossômica, e eventualmente apoptose (ZHOU; ELLEDGE, 2000). No longo prazo, DSBs podem resultar em mutações deletérias, contribuindo também com a oncogênese, além de aberrações cromossômicas (HOEIJMAKERS, 2001).

Após a ocorrência de uma DSB, uma complexa cascata de reações é acionada para recrutar fatores de reparo. As células eucarióticas realizam o reparo de DSBs por duas vias principais, sendo elas a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e

a recombinação homóloga (HR) (TAKATA et al., 1998) (Figuras 4 e 5). A NHEJ constitui um mecanismo emergencial para evitar a parada do ciclo celular e não é fiel à sequência original de DNA, podendo ocasionar mutações deletérias quando a DSB se localiza em região codificante (MAO *et al.*, 2009). Por outro lado, o reparo por HR é fidedigno à sequência original uma vez que a sequência homóloga é utilizada como molde para reconstituição da fita lesionada (TAKATA et al., 1998). Isso é possível graças a importante ação, dentre outros fatores, da RAD51. Esta atua na formação de um fragmento pré-sináptico responsável pela busca de regiões de homologia no cromossomo homólogo ou cromátide irmã (THOMPSON; SCHILD, 2001).

A primeira resposta das células às DSBs é a interrupção do ciclo celular, através da ativação de checkpoints, para haver tempo para o reparo dos danos (ZHOU; ELLEDGE, 2000). Quando a célula não consegue reparar a quebra no DNA, são ativados mecanismos de morte celular programada, por apoptose, para eliminação da(s) célula(s) lesionada(s) (BARTEK; LUKAS, 2007). A proteína ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) é ativada no início da resposta à DSB e ativa os checkpoints do ciclo celular, o reparo de DNA ou apoptose através da transdução de sinais para uma série de proteínas efetoras (Figura 3) (DABOUSSI et al., 2002).

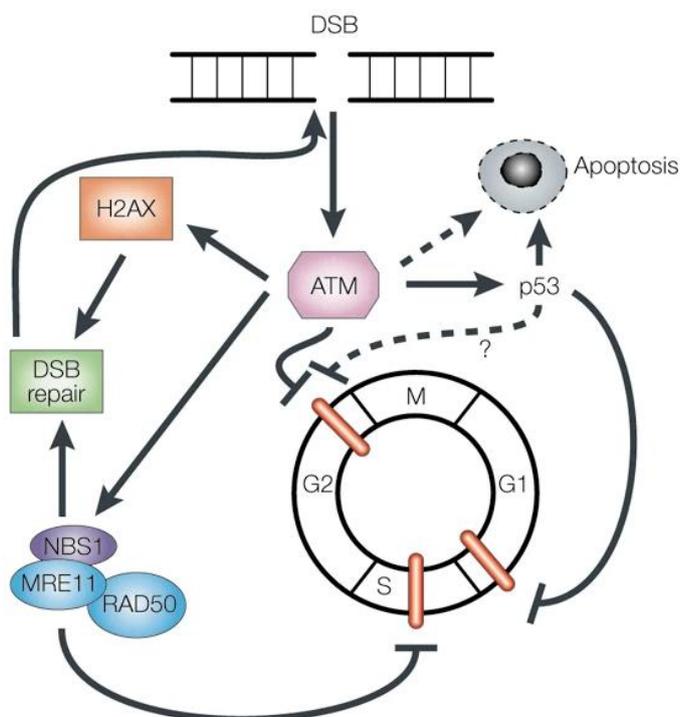


Figura 3: respostas celulares às DSBs.

As respostas às DSBs são guiadas pela proteína kinase ATM levando à interrupção do ciclo celular e posterior reparo ou apoptose. As barras vermelhas indicam os três principais pontos de verificação do ciclo celular; linhas tracejadas mostram que o efeito não é um caminho principal; e o ponto de interrogação diz que a existência desse caminho permanece controversa.

Fonte: (VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANAAR, 2001).

Diferentes condições celulares determinam a escolha entre NHEJ e HR para o reparo de DSBs. A NHEJ tem ocorrência predominante na fase de G1/pré-fase S, enquanto que a HR predomina nas fases S e G2 do ciclo celular (TAKATA et al., 1998). A replicação do DNA na fase S e presença da cromátide irmã após a replicação (G2) favorece a ocorrência de HR (JOHNSON, 2000). No entanto, dependendo da persistência e/ou acúmulo de DSBs, ambas as vias NHEJ e HR podem ser simultaneamente ativadas (SAINTIGNY et al., 2001). No caso da NHEJ, a DSB é reconhecida pelo heterodímero KU70/KU80 e a subunidade catalítica DNA-PKcs; então, a DNA ligase IV, conjuntamente ao cofator XRCC4, efetua a ligação das extremidades (Figura 4). Este mecanismo é naturalmente deletério devido ao processamento exonucleásico das extremidades da quebra para posterior ligação dessas por ação da DNA ligase (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016).

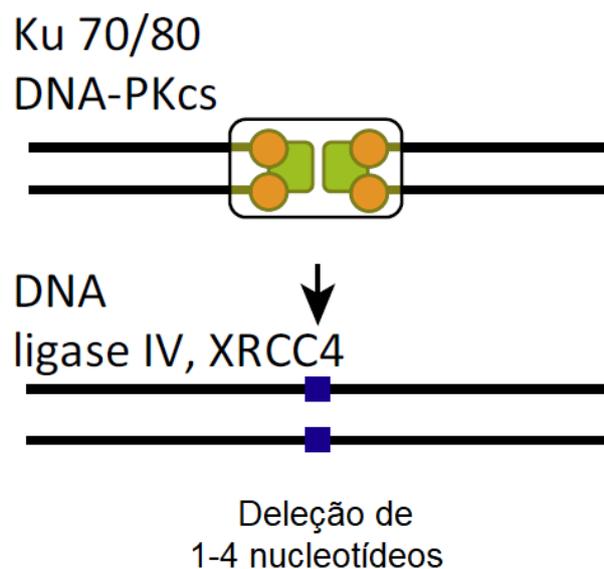


Figura 4: mecanismo de reparo por NHEJ.

Reconhecimento da quebra pelo complexo KU e catálise da junção por DNA ligase.

Fonte: (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016).

O mecanismo de reparo por HR inicia-se com o reconhecimento e sinalização da quebra pelo complexo MRN (LAMARCHE; ORAZIO; WEITZMAN, 2010), composto pelos peptídeos RAD50, MRE11 e NBS1 (HARPER; ELLEDGE, 2007). Este complexo serve como plataforma para ligação de outras proteínas de reparo. O complexo MRN é assessorado por P53BP1, o qual detecta distorções da estrutura da dupla-hélice, e, conseqüentemente, ativa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Esta, por sua vez, orchestra o reparo de DNA por HR por meio da fosforilação de um conjunto de moduladores envolvidos com a via (Figura 3) (DABOUSSI et al., 2002). Dentre estes, inclui-se a histona gama H2AX (γ H2AX), a qual, após sofrer fosforilação, se acumula no local da DSB (JIN; KIM, 2017).

A ressecção da fita de DNA é necessária para invasão da fita homóloga. Neste contexto, RAD52 e BRCA2 promovem a eficiente ligação de RAD51 a fita simples resultante (ROY; CHUN; POWELL, 2012)(NOGUEIRA et al., 2019). A ligação de parálogos da RAD51 como RAD51C e XRCC3 resulta num filamento nucleoproteico que invade o cromossomo homólogo à procura de regiões de homologia (YAMADA et al., 2004) (TAYLOR et al., 2015). Por fim, a extremidade 3' da fita danificada é estendida por ação polimerásica utilizando como molde a sequência homóloga (Figura 5) (SAN FILIPPO; SUNG; KLEIN, 2008).

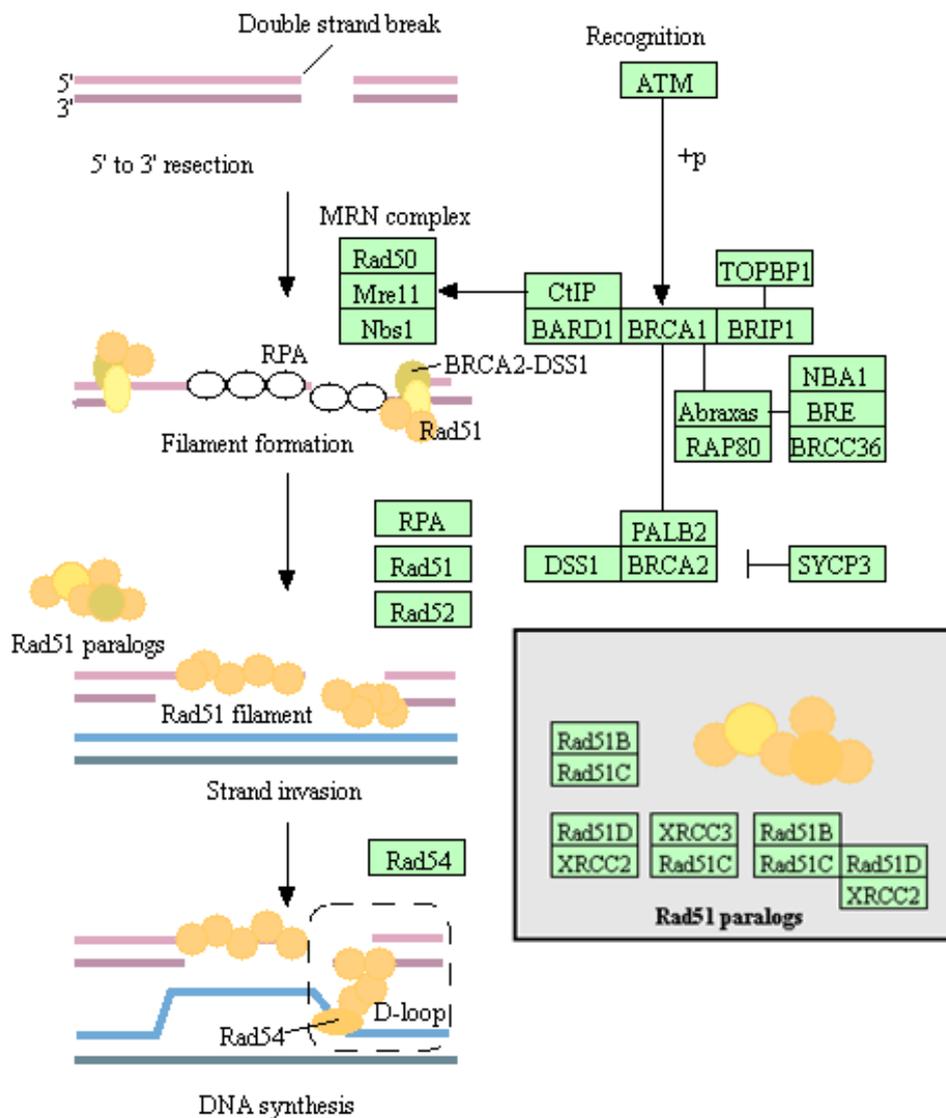


Figura 5: via de reparo por HR em mamíferos.

Com o reconhecimento da quebra de fita dupla pelo complexo MRN, a proteína ATM é ativada e desencadeia a cascata para recombinação homóloga, envolvendo diversas proteínas; com a interação de CtIP, o complexo MRN promove a ressecção das extremidades 5'. Proteínas de replicação RPAs são ligadas às extremidades 3' que impedem a formação de estruturas em grampos e degradação nucleotídica. Através dos mediadores RAD52 e BRCA2, a RAD51 é recrutada e se liga à fita simples pelas extremidades 3', substituindo RPAs, formando os filamentos de RAD51. Após a formação do filamento nucleoproteico com a interação dos parálogos da RAD51 ocorre a invasão da fita dupla guiada por RAD54, formando a estrutura de D-loop em busca da sequência de referência para o reparo. A síntese do DNA é então promovida por DNA polimerase (5'→3'), formando uma junção de *Holliday*, a qual é resolvida por endonucleases.

Fonte: KEGG PATHWAY (RAD51 mmu03440).

A RAD51 tem papel importante na forquilha de replicação, mecanismo crítico para a manutenção da integridade cromossômica e do ciclo celular. A RAD51 medeia os mecanismos para prevenir a interrupção da forquilha de replicação quando ocorre uma quebra no DNA, promovendo o reparo por HR restaurando a replicação em andamento (Figura 6) (YOON et al., 2014).

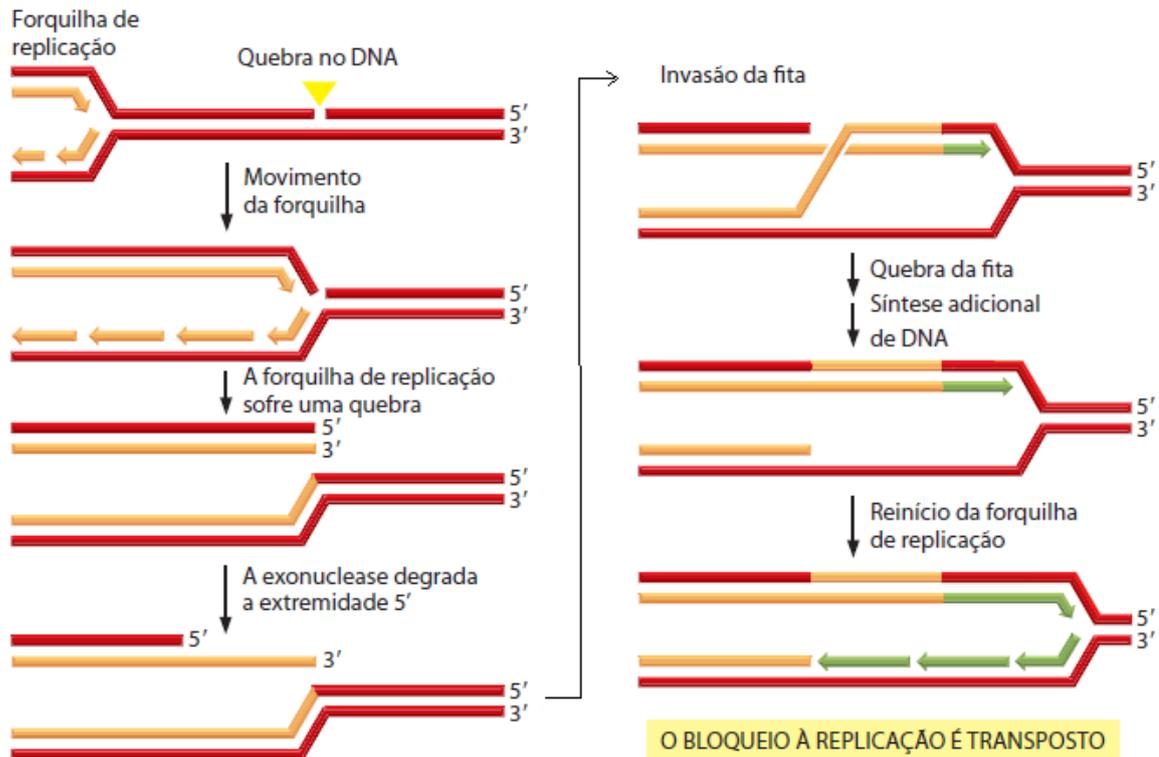


Figura 6: Reparo por recombinação homóloga de uma forquilha de replicação quebrada.

Quando uma forquilha de replicação em movimento encontra uma quebra, ela irá parar, mas pode ser corrigida por recombinação homóloga. Como mostrado, a invasão inicial de fitas requer uma extremidade 3' livre gerada por uma nuclease que degrada a extremidade 5' da fita complementar. A recombinação então inicia com a invasão de fitas guiada pela RAD51.

Fonte: adaptado de (ALBERTS, 2010).

2.4. REPARO DE DSBs em oócitos

Em oócitos imaturos, uma vez que o ciclo celular encontra-se bloqueado na meiose em prófase I, eventos de checkpoints não são necessários para bloqueio do ciclo e subsequente reparo de DSB (CARROLL; MARANGOS, 2013). No entanto, é surpreendente que o checkpoint de danos ao DNA não seja bem estabelecido em oócitos de mamíferos durante a retomada da meiose. Enquanto DSBs resultam no bloqueio de células somáticas na fase de G2, DSBs não afetam o tempo ou a taxa de retomada da meiose em oócitos crescidos (MARANGOS; CARROLL, 2012). Mesmo a indução de DSBs por irradiação ou tratamento com etoposide (agente indutor de DSBs) tem pouco efeito sobre a retomada da meiose, muito embora resultem em acúmulo de γ H2AX e aberrações cromossômicas (MA et al., 2019). Somente sob indução de danos severos é possível observar algum atraso na retomada da meiose (MARANGOS; CARROLL, 2012). Embora não completamente caracterizado, a inexistência no oócito de um mecanismo confiável de checkpoint de danos ao DNA

parece ser explicada por sua limitada capacidade em ativar ATM, e efetores *downstream* como CHK1, bem como devido a diferenças na configuração da cromatina (NIE et al., 2017). Por outro lado, há evidências de que o oócito seja capaz de reparar danos ao seu DNA em estágios posteriores como durante a metáfase I ou II, ou ainda durante a embriogênese inicial (MARANGOS; CARROLL, 2012). Após indução de DSBs (por etoposide) em oócitos imaturos (estágio de GV), observa-se acúmulo de focos de γ H2AX e recrutamento de RAD51, os quais permanecem na fase inicial da retomada da meiose (GVBD) e gradualmente desaparecem ao final da GVBD, indicando a ocorrência de reparo, porém a partir de um limiar de quebras de DNA (MA et al., 2019).

O oócito também possui DMC1, uma recombinase meiose-específica, cuja função se associa à RAD51, onde ambas colocalizam nos sítios de DSBs (BISHOP, 1994), sugerindo que a ação conjunta de DMC1 e RAD51 tem papel central na HR em células meióticas (SHINOHARA et al., 2000).

Além de atuar no reparo de DSBs, a maquinaria de HR desempenha também importante função na resolução de quiasmas (junções de *Holliday*) necessária para correta segregação cromossômica no oócito (KUZNETSOV et al., 2007). Assim, defeitos na maquinaria de reparo de DNA têm importante impacto sobre a viabilidade do oócito, podendo resultar em erros de segregação cromossômica e maior propensão a morte por apoptose ou bloqueios no desenvolvimento embrionário (MACLENNAN et al., 2015). Essas anomalias se acentuam com a idade e se associam com a menor expressão de genes da maquinaria de HR no oócito como *Atm*, *Mre11*, *Rad51* e *Brca1* (TITUS et al., 2013). A reduzida expressão desses genes também se associa ao acúmulo de DSBs em oócitos de mulheres mais velhas, sendo considerado um importante fator determinante da infertilidade (TITUS; STOBESKI; OKTAY, 2015). Evidência disso, é que o declínio da fertilidade é um dos primeiros sintomas do envelhecimento em humanos.

Apesar de a maioria dos estudos envolvendo reparo de DSBs em oócitos focarem nos efeitos sobre o nDNA, é possível que defeitos na maquinaria de HR também afetem o mtDNA. Em acordo com isso, a interferência por RNA sobre a expressão de *Rad51* durante a maturação *in vitro* de oócitos resultou em grave disfunção mitocondrial (KIM et al., 2016). Como resultado, houve significativo impacto da deficiência de RAD51 sobre a progressão meiótica. No entanto, o momento do

desenvolvimento oocitário em que este estudo foi realizado não permitiu isolar os efeitos da RAD51 na mitocôndria daqueles no núcleo.

2.5. REPARO DO mtDNA

A intensa replicação a que o mtDNA é submetido durante o crescimento do oócito pode resultar em erros replicativos, com a consequente interrupção da forquilha de replicação ou geração de mutações (SAGE; KNIGHT, 2013). Vale ressaltar que a herança mitocondrial é exclusivamente materna, sendo, portanto, de fundamental importância a existência de mecanismos no oócito que garantam a estabilidade da sequência de mtDNA. Ademais, vários trabalhos forneceram evidências de que o aumento do número de cópias de mtDNA no oócito é determinante para a viabilidade do gameta (WAI et al., 2010). Assim, é de suma importância que a mitocôndria disponha de mecanismos de reparo que atuem em prol da replicação e integridade do mtDNA. Pouco se sabe sobre esses mecanismos de reparo, porém, é sabido que a mitocôndria compartilha parte do mesmo conjunto de enzimas envolvidas no núcleo com o reparo de DNA (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010).

Apesar das incertezas acerca da ocorrência de HR no mtDNA de mamíferos, muitas das proteínas envolvidas na maquinaria de reparo de DSBs por HR, incluindo MRE11, RAD51, RAD51C e XRCC3 estão presentes na mitocôndria (KAWABATA; KAWABATA; NISHIBORI, 2005) (DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011). Já foi também descrito que essas proteínas têm importante papel na mitocôndria sob condições de estresse oxidativo, quando interagem com o mtDNA para garantirem a sua replicação (SAGE, 2013). Enquanto em células selvagens o estresse oxidativo leva a um aumento no número de cópias de mtDNA, em células deficientes em RAD51, RAD51C ou XRCC3, o mesmo estresse leva a depleção de mtDNA (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010). O importante papel da RAD51 em mediar a replicação do mtDNA foi também constatado em células durante a depleção de mtDNA, após tratamento com indutor de depleção de mtDNA (brometo de etídio) (SAGE; KNIGHT, 2013). Portanto, uma vez que a RAD51 exerce função central na HR, é possível que ela atue na mitocôndria para dar suporte a replicação e manutenção da estabilidade do mtDNA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterização dos efeitos do nocaute condicional do gene *Rad51* sobre o DNA mitocondrial e a divisão meiótica em oócitos murinos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validação do modelo animal pela avaliação da expressão de *Rad51* em oócitos e células do cumulus.

Análise de expressão de genes da via de reparo por HR e do desenvolvimento oocitário.

Análise do número de cópias de mtDNA em oócitos.

Análise da estabilidade da divisão meiótica em oócitos.

4. HIPÓTESES

A deleção oócito específica de *Rad51* deve resultar em depleção de cópias de mtDNA e bloqueio da divisão meiótica nos oócitos.

5. MATERIAIS & MÉTODOS

5.1. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os camundongos são mantidos em nosso biotério seguindo-se o *Guide for the Care and use of Laboratory Animals* (GARBER, 2011). Os animais têm acesso

ilimitado a água e ração (Presence Ratos e Camundongos, Purina), e são mantidos a 22 °C em ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro (NAGY et al., 2003).

Para o desenvolvimento do modelo animal foram empregadas duas linhagens de camundongos geneticamente modificados: uma na qual o gene *Rad51* foi flanqueado por sequências *loxP* (*floxed – fl*), e outra apresentando o transgene *Cre-recombinase* fusionado ao promotor do gene *Zp3* (*Zp3-Cre*) que é expresso somente em oócitos.

A linhagem C57BL/6-Tg(*Zp3-cre*)93Kw/J (genótipo *Zp3-Cre^{+/+}*) foi adquirida da JAX (DE VRIES et al., 2000) enquanto que a linhagem *Rad51^{fl}* foi doada pelo Prof. Dr. Rodrigo Martins da UFRJ.

5.2. ACASALAMENTOS

Os animais da linhagem *Rad51^{fl}* com genótipo *Rad51^{fl/+}* adquiridos da UFRJ também apresentavam outras modificações genéticas indesejadas que vinham sendo utilizadas em estudos paralelos: *Pax6-cre* e *Atrip^{fl}*. Os animais da linhagem *Zp3-cre* também continham uma mutação de ocorrência natural no gene *Nnt* (e.g., *Nnt^{mut/mut}*); a mutação no *Nnt* sabidamente afeta a função mitocondrial (RONCHI et al., 2013). Essas alterações foram eliminadas por meio de sucessivos acasalamentos com animais selvagens (WT), mantendo os genótipos de interesse.

Após alguns acasalamentos, foram selecionados animais selvagens para *Atrip* e *Pax6-cre*, mantendo *Rad51^{fl}*. Em seguida foram acasalados animais de genótipo *Rad51^{fl/+}* com animais *Zp3-Cre^{+/+}* *Nnt^{mut}*; desses cruzamentos, foram selecionados machos apresentando genótipo *Rad51^{fl/+}* *Zp3-Cre^{+/-}*, pois a presença de *Zp3-Cre* em fêmeas ocasiona a excisão do alelo floxed, que é visado apenas nas progênes experimentais. Esses machos foram acasalados com fêmeas de genótipo *Rad51^{fl/+}*; assim, com as progênes desse cruzamento, obteve-se os animais constituintes das matrizes do modelo experimental: machos *Zp3-Cre^{+/-}* *Rad51^{fl/fl}* e fêmeas *Zp3-Cre^{-/-}* *Rad51^{fl/fl}* (Figura 7). Então, as fêmeas da progênie resultante desse cruzamento constituem os dois grupos experimentais: WT – *Zp3-Cre^{-/-}* *Rad51^{fl/fl}* e KO (*Rad51^{-/-}*) – *Zp3-Cre^{-/-}* *Rad51^{fl/fl}* (Figura 7). Nos experimentos foram sempre utilizados animais

Rad51^{fl/fl} e *Rad51^{-/-}* provenientes da mesma ninhada e diferindo somente pela presença do transgene *Zp3-Cre* nos nocautes.

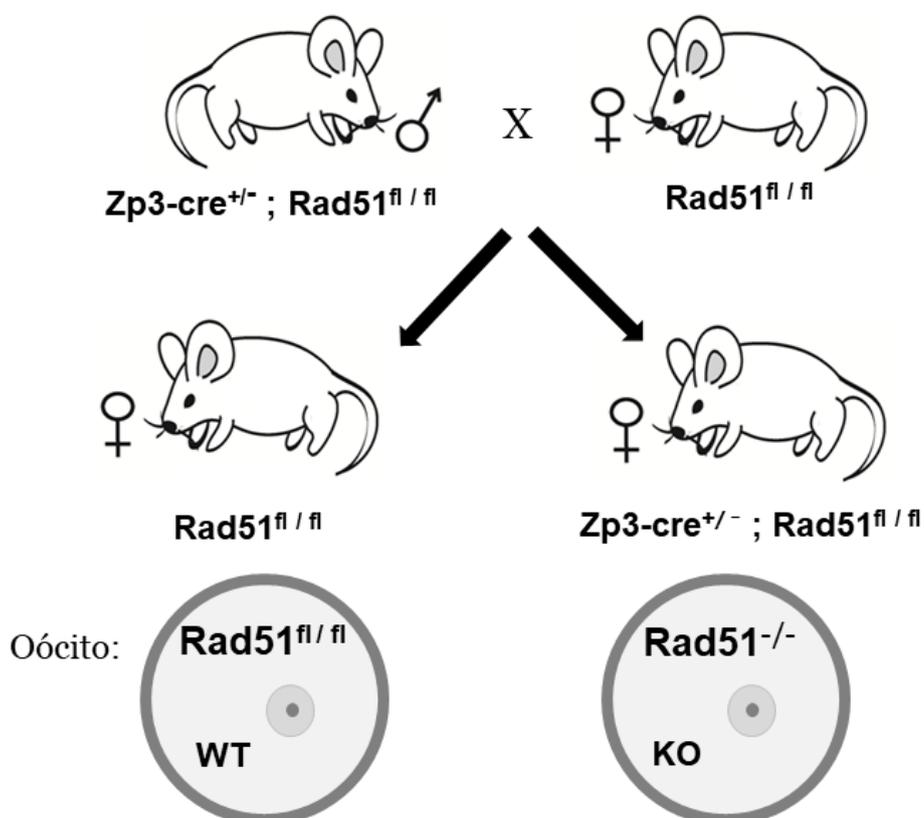


Figura 7: acasalamento das matrizes experimentais.

Ilustração do acasalamento entre machos e fêmeas do modelo experimental, as fêmeas nascidas desses acasalamentos são utilizadas nos experimentos, constituindo os grupos WT (*Rad51^{fl/fl}*) e KO (*Rad51^{-/-}*), com 50% de frequência genotípica, determinada pela herança do *Zp3-Cre*.

Fonte: elaborada pelo autor.

Em trabalho paralelo em nosso grupo, as fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* foram acasaladas com machos selvagens naturais (*Rad51^{+/+}*, ausência de sequências *floxed* e *Zp3-Cre*) (Figura 8), para teste de fertilidade, e o grupo *Rad51^{-/-}* foi capaz de gerar filhotes, contra as expectativas, contudo apresentam quadro de subfertilidade. Os animais das progênes de cruzamentos de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* foram genotipados para confirmação e sequenciamento do alelo excisado (-).

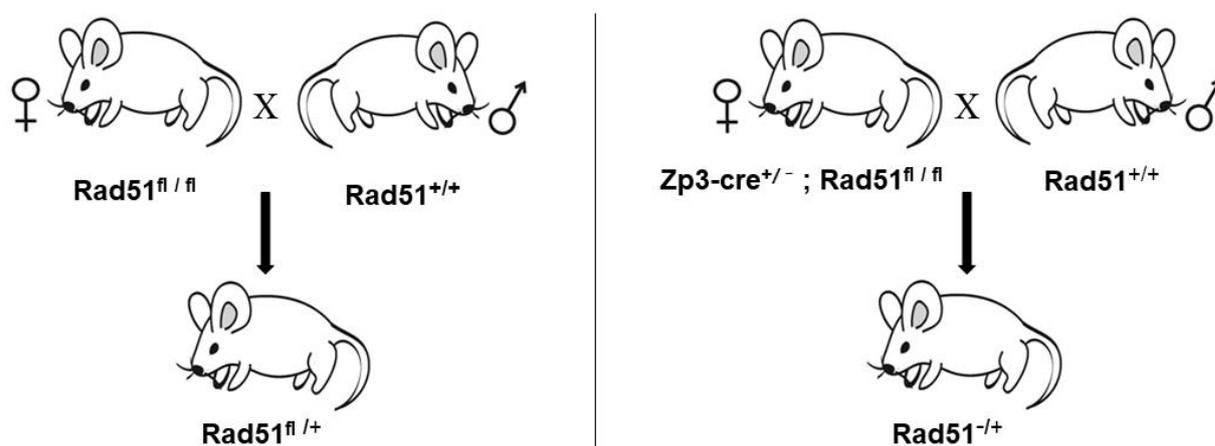


Figura 8: acasalamento de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* com machos selvagens.

Acasalamentos realizados para teste de fertilidade, a progênie das fêmeas KO são *Rad51^{-/-}*, um alelo excisado (-) proveniente do oócito e o alelo selvagem (+) paterno.

Fonte: elaborada pelo autor.

As fêmeas *Rad51^{-/-}* apresentam bloqueio embrionário de parte da progênie, caracterizando-as como subférteis. Na tentativa de identificar o momento em que ocorre bloqueio embrionário, fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* foram casadas com machos selvagens e foi verificado o plug vaginal para identificação do coito. Os botões embrionários foram coletados no dia 8,5 pós-coito para identificação de fetos.

5.3. GENOTIPAGENS

As genotipagens dos animais são realizadas utilizando DNA total extraído de biópsia de orelha. As amostras são incubadas com 200 uL de solução de digestão (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL gelatina, 0,45% Nonidet P-40; 0,45% Tween-20 e 100 µg/mL proteinase K) por 3 horas a 65 °C. Em seguida, incubadas por 20 minutos a 95 °C para inativação da proteinase K e armazenadas a -20 °C até o uso. As amostras digeridas foram centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos, e o sobrenadante foi diluído 10x em água ultra pura (ThermoFischer Scientific) para a genotipagem (MACHADO et al., 2015). As genotipagens foram conduzidas através de reações de PCR convencionais utilizando-se primers (Tabela 1) específicos para as sequências de interesse.

Tabela 1: primers empregados nas reações de PCR para genotipagens.

Primer	Sequência 5'→3'	Amplicon (pb)
Rad51 ^{fl} F	TCCCTTACCCTGCGTTATAAGC	WT – 517
Rad51 ^{fl} R	GGTGGAGTACAG GACAGAAG	fl – 474
Atrip ^{fl} F	ATGTATCTTTCTTC CAGGGTC	WT – 684
Atrip ^{fl} R	CGTTATCTTATCTTT CATTTGGC	fl – 806
Pax6-Cre F	ATTTGCCTGCATTAC CGGTCC	700
Pax6-Cre R	CCCCAGAAATGCCAGATTACGTATATC	
Controle interno F	CTAGGCCACAGAATT GAAAGATCT	324
Controle interno R	GTAGGTGGAAATTC TAGCATCATCC	
NNT WT F	GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG	579
NNT WT R	GTAGGGCCAACT GTTTCTGCATGA	
NNT MUT F	GTGGAATTCCGCTGAGAGAGAACTCTT	743
NNT MUT R	GTAGGGCCAACT GTTTCTGCATGA	
Zp3-Cre F	TTGATAATGGGCTC CACCCG	262
Zp3-Cre R	GCGAACCTCATCA CTCGTTG	
Rad51 excisado F	GCACATGCTTTTCTCCACCG	322
Rad51 excisado R	TAGCTTCCTCAGGGTCACCA	

Fonte: elaborada pelo autor.

As reações de PCR foram preparadas com JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich), em volume de 15 uL de reação, com primers na concentração de 400 nM. As ciclagens das reações de PCR para cada primer são descritas na tabela 2.

Tabela 2: ciclos de PCR utilizados na amplificação dos fragmentos de interesse.

Alvo	Ciclos					
	Desnaturação		Anelamento		Extensão	
	T (°C)	t	T (°C)	t	T (°C)	t
Rad51 ^{fl}	94	30 s	60	1min	72	2min
Atrip ^{fl}	95	30 s	56	1min	72	2,5min
Pax6-Cre	94	1 min	58	1min	72	1min
NNT	94	30 s	58	30 s	72	2min
Zp3-Cre	94	30 s	60	30 s	72	2min
Rad51 excisado	94	30 s	60	1min	72	2min

Obs: Ciclagens baseadas nos primers, indicando as respectivas temperaturas e duração (t) das etapas de desnaturação, anelamento e extensão.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os produtos de amplificação são então aplicados em gel de agarose 2%, submetido a uma tensão de 90 V por 50 minutos. Para visualização das bandas foi utilizado a sonda SYBR Safe (ThermoFischer Scientific) e análise em Chemidoc (BioRad).

5.4. COLETA DE OÓCITOS IMATUROS

Fêmeas de 19-21 dias, com genótipo selecionado, foram superovuladas através da administração de 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) via intraperitoneal. Então, após 42 a 44 horas da injeção as fêmeas foram sacrificadas e tiveram os ovários dissecados em solução fisiológica. Os ovários foram transferidos para meio MEM – alpha tamponado com HEPES (ThermoFisher Scientific). Os folículos antrais foram rompidos com agulha 30G, resultando na liberação dos complexos cumulus-oócito (COCs) (NAGY et al., 2003); os oócitos foram então desnudados das células do cumulus com o uso de capilar de vidro (diâmetro interno de 60-100 μm). Os oócitos imaturos, em estágio de vesícula germinativa (GV), foram então selecionados e coletados individualmente em tubos de 0.2 mL, para análise de cópias de mtDNA, em solução salina fosfatada (PBS; Sigma-Aldrich) e mantidos a -80°C até o uso. Oócitos imaturos também foram coletados em pools de 15, em tubos de 0.2 mL, em PBS e mantidos a -80°C , para posterior análises de expressão gênica. As células do cumulus também foram coletadas para análises de expressão gênica e confirmação da especificidade do nocaute. Também foram coletados pools de aproximadamente 25 oócitos GV, em tubos de 0.2 mL, em PBS para análises de western blot e imunofluorescência.

5.5. COLETA DE OÓCITOS OVULADOS

Fêmeas de 19-21 dias, com genótipo selecionado, foram superovuladas com administração de 5 U.I. de eCG via intraperitoneal, e após 47 horas, a ovulação foi estimulada através da administração de 5 U.I. de hCG (gonadotrofina coriônica humana) via intraperitoneal. Então, após 12-13 horas da injeção de hCG, as fêmeas

foram sacrificadas e tiveram os ovários, juntamente com os ovidutos, dissecados em solução fisiológica. Os ovários foram transferidos para meio MEM – alpha tamponado com HEPES (ThermoFisher Scientific). Os ovidutos foram rompidos com agulha 30G, resultando na liberação dos oócitos ovulados circundados pelas células do cumulus. Os oócitos foram então desnudados das células do cumulus em solução de 0,3% de hialuronidase (Sigma-Aldrich) em MEM – alpha + HEPES (NAGY et al., 2003). Em seguida, os oócitos foram lavados em meio MEM – alpha + HEPES, e os oócitos foram analisados quanto a presença do primeiro corpúsculo polar (PB1), para atribuição do número de oócitos que extruíram o PB1 e para seleção de oócitos para experimentos posteriores, nos quais foram utilizados apenas oócitos com o PB1. Após a contabilização da extrusão do PB1, foram coletados em PBS oócitos ovulados em tubos individuais para análises de cópias de mtDNA e também pools de aproximadamente 20 oócitos de cada animal para análises em microscopia confocal.

5.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA

O número de cópias de mtDNA de oócitos (imaturos e maduros) foi determinado por qPCR como descrito em (MACHADO et al., 2015). Para tanto, utilizou-se um primer (MT 14/15) específico para um fragmento do mtDNA de camundongo, abrangendo parte dos genes *mt-Tq*, *mt-Tm* e *mt-Nd2*, e também um primer para outra região do mtDNA abrangendo o gene *mt-Nd1* (tabela 3).

Tabela 3: primers empregados para mensuração de cópias de mtDNA.

Primer	Alvo	Sequência 5'→3'
MT14 (F)	mtDNA (<i>mt-Tq</i> ,	CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC
MT15 (R)	<i>mt-Tm</i> e <i>mt-Nd2</i>)	GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG
ND1 F	mtDNA	TCCGAGCATCTTATCCACGC
ND1 R	(<i>mt-Nd1</i>)	GTATGGTGGTACTCCCGCTG
Nuclear F	<i>Apob</i>	CACGTGGGCTCCAGCATT
Nuclear R	(DNA nuclear)	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG

Fonte: elaborada pelo autor.

Primeiramente, os oócitos individuais foram lisados em 5 uL de solução de digestão (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 µg/mL proteinase K) por 3 horas a 65°C. Em seguida, incubados por 20 minutos a 95°C para inativação da proteinase K. Sucessivamente, os oócitos lisados foram diluídos em 45 uL de água, e aplicados na reação de qPCR em placa de 96 poços. Cada oócito foi analisado individualmente em triplicata. As reações de qPCR foram conduzidas em 15 uL, utilizando SYBR Green Master Mix (ThermoFischer Scientific) e os primers a concentração de 200 nM. As amplificações foram realizadas utilizando o sistema de qPCR 7500 Fast (ThermoFisher Scientific) e o seguinte ciclo térmico: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 1 minuto. A fluorescência do SYBR Green foi mensurada ao final de cada ciclo. Para determinação do número de cópias de mtDNA, foi amplificada em paralelo às amostras uma curva padrão, a qual consiste de DNA plasmidial (pDNA) contendo um fragmento do mtDNA de camundongos que abrange a região flanqueada pelo primer. As amostras de pDNA foram previamente preparadas e estocadas a -80°C, em concentração de 0,2 .10⁸ cópias/µL. A curva foi preparada por diluição do pDNA a concentrações de 0,2 .10⁶; 0,2 .10⁵; 0,2 .10⁴ e, 0,2 .10³. O cálculo da quantidade de cópias de mtDNA por oócito foi baseado na curva padrão de pDNA através de uma regressão linear.

Também foram analisadas cópias de mtDNA de fígado, coletados da progênie de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*, por ser um tecido de alta replicação de mtDNA. Os animais tiveram o fígado coletado na terceira semana de vida. Foi extraído o DNA total dos fígados pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL., 2000), estes então foram amplificados por qPCR com o primer MT 14/15 em paralelo ao primer de um fragmento de um gene nuclear (*Apob*) (Tabela 3) que sabidamente tem duas cópias no genoma diploide. O cálculo do número de cópias de mtDNA por célula em cada amostra foi feito pela normalização da quantidade de mtDNA em relação ao fragmento nuclear (o qual tem duas cópias em cada célula):

$$\text{cópias}_{mtDNA}/\text{célula} = 2 \times 2^{-\Delta Ct} ,$$

onde $\Delta Ct = Ct_{\text{médio}}\text{mitocondrial} - Ct_{\text{médio}}\text{nuclear}$ (NICKLAS et al., 2004).

5.7. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

Para análise de expressão gênica, foram coletados oócitos imaturos em pools de 15 e também as respectivas células do cumulus. O RNA total das amostras foi extraído utilizando o reagente trizol (ThermoFischerScientific) pelo método trizol/clorofórmio, conforme descrito em (MACABELLI et al., 2014). O RNA extraído foi tratado com DNase I (ThermoFisherScientific) e convertido a cDNA utilizando o kit High-CapacityDNA Reverse Transcription kit (ThermoFisherScientific).

Os primers específicos para os transcritos-alvo, desenhados utilizando a ferramenta PrimerBLAST (NCBI), estão listados na Tabela 4. Para os oócitos, foram analisados os transcritos *Rad51*, *Rad51C*, *Xrcc3*, *Rad52*, *Atm*, *Brca1*, *Brca2*, sendo estes genes da via de reparo por recombinação homóloga (HR); foram também analisados *p53*, gene que responde à quebras de dupla fita de DNA (DSBs); *Dmc1*, recombinase de função associada à RAD51 na meiose; *Gdf9*, *Bmp15*, *Cdh1*, *Fgf8b*, genes dos fatores de crescimento secretados pelo oócito; e os normalizadores endógenos (*housekeepings*) *Rps18* e *Rpl19*. Também foi testada a *Ppia*, porém esta não foi utilizada na normalização dos dados uma vez que a sua expressão se mostrou bastante variável em comparação com o *Rps18* e *Rpl19*.

Para as células do cumulus, foram analisados os transcritos: *Rad51*, *Inhba*, *Inhbb*, *Fshr*, *Kitl* e os *housekeepings* *Rps18* e *Rpl19*.

As quantidades relativas dos transcritos alvo foram analisadas por qPCR utilizando o equipamento 7500Fast Real-Time PCR (ThermoFisherScientific). Para tal, foi utilizado SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFischer Scientific) e os primers específicos para os genes alvo a concentração de 200 nM nas reações, assim como genes *housekeepings*. As amostras de cDNA foram diluídas 10x em água ultra pura (ThermoFischer Scientific) e foi utilizado 2 uL da diluição por reação (de 15 uL), analisadas em duplicata. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 1 minuto.

O cálculo da expressão relativa dos transcritos alvo foi conduzido pela normalização com os *housekeepings*, utilizando a média geométrica dos *Cts* ($Ct_{housekeepings}$):

$$expressão\ relativa = 2^{-\Delta Ct}, \quad \Delta Ct = Ct_{gene\ alvo} - Ct_{housekeepings}$$

Tabela 4: primers empregados para análises de expressão gênica. Fonte: elaborada pelo autor.

Primer	Alvo	Sequência 5'→3'
Rad51 F	Rad51	GCTGATGAGTTTGGTGTCCG
Rad51 R		TTGGGATCTGCAGCGAACAT
Rad51C F	Rad51C	CACACACGGAAGAAGAACATCAG
Rad51C R		AGGAGATAGACTTGTGCCAGC
Xrcc3 F	Xrcc3	GCCCCATTTTCGTTGTGAGTTC
Xrcc3 R		TGTCTGTACCTGGTTGATG
Rad52 F	Rad52	TTGGGAATGCACTTGGAAACTG
Rad52 R		ACATCAAGAGGGAGCTGTCCG
ATM F	ATM	GATCTCGTGCCTTGGCTACA
ATM R		TATGGGATGCGTTCTCCAGC
Brca1 F	Brca1	ACATGTCAGGAGCAGCAATTTT
Brca1 R		TGGGACCCTCCAGATGTTGT
Brca2 F	Brca2	ACTGTTGACGCAGTTGGACA
Brca2 R		TGCCATCTGGAGTGCTTTTTG
p53 F	p53	GGAAGACTCCAGTGGGAACC
p53 R		CTTCTGTACGGCGGTCTCTC
DMC1 F	Dmc1	TGGGTTTCGAGTCGGGAATTG
DMC1 R		CCATGCTTCTGCAACAGGTC
Gdf9 F	Gdf9	CAACCAGGTGACAGGACCG
Gdf9 R		CACCCGGTCCAGGTTAAACA
Bmp15 F	Bmp15	AAGGGAGAACCGCACGATTG
Bmp15 R		TGTACATGCCAGGAACCTCTG
Cdh1 F	Cdh1	ATGTCCTGGGCAGAGTGAGA
Cdh1 R		TGGAGCTTTAGATGCCGCTT
Fgf8b F	Fgf8b	GCTAATTGCCAAGAGCAACGG
Fgf8b R		AGCGCCGTGTAGTTGTTCTC
Inhba F	Inhba	GGGACCCGAAAGAGAATTTGC
Inhba R		TCCTCTCAGCCAAAGCAAGG
Inhbb F	Inhbb	TTTGCAGAGACAGATGGCCT
Inhbb R		GAAGAAGTACAGGCGGACCC
FSHr F	FSHr	GGAGGGCCAGGTCAACATACC
FSHr R		GAAGTCAGAGGTTTGCCGC
Kitl F	Kitl	TGCTGGTGCAATATGCTGGA
Kitl R		GTGATAATCCAAGTTTGTGTCTTCT
Rps18 F	Rps18	ACTTTTGGGGCCTTCGTGTC
Rps18 R		GCAAAGGCCAGAGACTCAT
Rpl19 F	Rpl19	TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC
Rpl19 R		ATCAGCCCATCCTTGATCAGC

5.8. WESTERN BLOT

Foram reunidos pools de 200 oócitos de cada grupo experimental para a análise por western blot (MARANGOS, 2016). A lise dos oócitos foi feita com mix de tampão Ripa (25 mM Tris HCl pH 7,6; 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS) e inibidores de protease (NaF 10 mM, orto 10 mM e sigma fast 1x). Em cada pool de oócitos foi adicionado 7,5 μ L de tampão de lise e 2,5 μ L de tampão de amostra 4x (β -mercaptoetanol) (Bio-Rad). Então, as amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos. Após isso, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) para separação das proteínas por eletroforese. A corrida foi realizada a 100 V por 1 h (ou até que a última banda do *ladder* atingisse o fundo do gel).

Após a eletroforese foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF, em sistema submerso por uma hora e meia sob tensão de 120 V. Depois da transferência, foi feito o bloqueio da membrana em solução de 5% BSA (albumina sérica bovina) por 3 h. A membrana foi então incubada overnight com anticorpo primário anti-RAD51 (cat. # ABE257, Sigma-Aldrich) (1:1000) e, após a incubação o anticorpo foi recuperado e a membrana lavada por 15 minutos em tampão TTBS (TrisHCl pH 7,2 0,05M; NaCl 0,1M; tween 0,05%), repetindo a lavagem 3 vezes. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h em anticorpo secundário conjugado à peroxidase (cat. # 04-18-06 e 04-15-06, KPL). O resultado foi revelado por exposição com reagentes ECL (luminol + peróxido). A mesma membrana foi depois incubada com o anticorpo anti-Tubulina (anti-TUBA1A (cat. # A11126, ThermoFisher Scientific)) (1:1000) para marcação do controle endógeno.

5.9. IMUNOFLUORESCÊNCIA

A estabilidade da divisão meiótica foi avaliada por meio da técnica de imunofluorescência, segundo (SELESNIEMI et al., 2011), para visualização do fuso meiótico (metáfase II) dos oócitos, marcando os microtúbulos com o anticorpo anti-TUBA1A e os cromossomos com o corante Hoechst (Sigma Aldrich).

Oócitos ovulados (PB1) coletados de fêmeas WT e KO e foram tratados com ácido tyrode (PBS pH 2,5) para remoção da zona pelúcida para possibilitar a marcação com anticorpos. Em seguida os oócitos foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% durante 4 horas, e depois lavados em PBS. Os oócitos foram permeabilizados em solução de PBS com 0,1% de triton X-100 e 0,05% tween durante 30 minutos a temperatura ambiente, então lavados em PBS e colocados em solução de bloqueio: PBS com 1% de BSA e 0,1M de glicina, durante 3 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio os oócitos foram colocados em solução (PBS) contendo os anticorpos primários anti-TUBA1A (cat. # A11126, ThermoFisher Scientific) e anti RAD51 (cat. # ABE257, Sigma-Aldrich) (1:200) e incubados overnight a 4 °C. Depois da incubação com anticorpos primários, os oócitos foram subsequentemente lavados em PBS, e colocados em solução (PBS) com anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor – 488 (verde) e 594 nm (vermelho) (1:250) e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Então, foram novamente lavados em PBS e analisados em microscopia confocal (LSM 780, Zeiss).

5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas e representações gráficas dos resultados foram feitas no *software* GraphPad Prism 8. As análises envolveram dois grupos, os dados que apresentaram distribuição gaussiana foram comparados entre si por teste t não pareado, enquanto que se algum dos grupos apresentou distribuição não gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados quanto a média e erro padrão da média. Diferenças com valores de P menor que 0,05 foram consideradas significativas.

6. RESULTADOS

6.1. ACASALAMENTOS E GENOTIPAGENS

Para estabelecimento do modelo animal foram inicialmente utilizados animais floxed (fl) para *Rad51* (e.g., *Rad51^{fl/fl}*) e animais transgênicos para *Zp3-Cre* (DE VRIES et al., 2000). Essas linhagens apresentavam também outras alterações genéticas (*Pax6-Cre*, *Atrip^{fl/fl}* e *Nnt^{mut/mut}*). Uma vez que essas alterações eram indesejáveis para o presente trabalho, a progênie resultante dos acasalamentos iniciais foi genotipada e somente animais selvagens para essas alterações foram utilizados nos acasalamentos seguintes (Figuras 9 e 10).

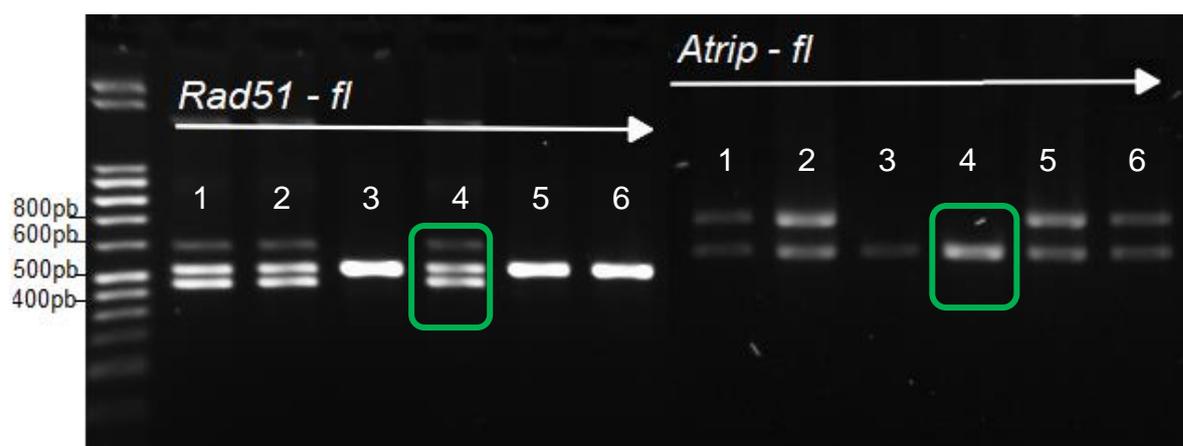


Figura 9: gel de agarose correspondente à genotipagem para *Rad51^{fl}* e *Atrip^{fl}*.

Animais heterozigotos para *Rad51^{fl}* (*Rad51^{+/fl}*) apresentam duas bandas (banda selvagem = 517 pb e banda “floxed” = 474 pb), enquanto que os animais que não têm o alelo floxed apresentam apenas a banda selvagem (de cima). Para formação das matrizes foram selecionados animais que apresentavam a banda floxed. Para o *Atrip* (banda selvagem = 684 pb e banda “floxed” = 806 pb) foram selecionados animais que apresentaram apenas o alelo selvagem, como o animal “4” destacado em verde, o qual apresenta o seguinte genótipo: *Rad51^{fl/+}* e *Atrip^{+/+}*.

Fonte: elaborada pelo autor.

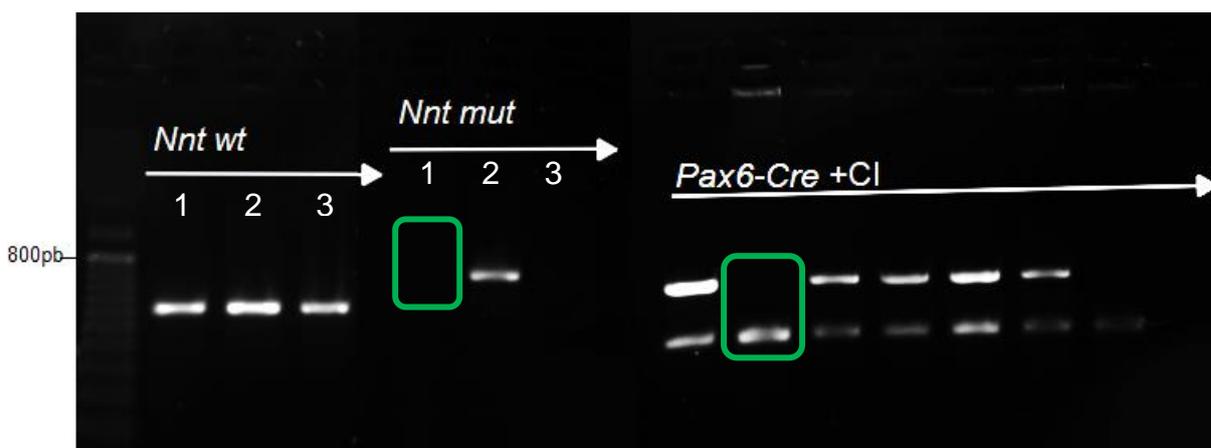


Figura 10: gel de agarose correspondente à genotipagem para *Nnt* e *Pax6-Cre*.

A banda *Nnt^{WT}* possui 579 pb, e a mutante (*Nnt^{MUT}*) 743 pb. Estas foram analisadas separadamente por que são utilizados primers distintos para as formas *WT* e *MUT* do *Nnt*. Destacado em verde (“1”) encontra-se um animal selecionado para ser utilizado nos acasalamentos seguintes por não possuir a banda referente à mutação no *Nnt*. A banda do *Pax6-Cre* possui 700 pb; a banda de 324 pb corresponde ao controle interno amplificado conjuntamente. Foram selecionados animais não portadores de *Pax6-Cre*, como destacado em verde.

Fonte: elaborada pelo autor.

Ao final, foram selecionados os animais constituintes das matrizes experimentais, sendo machos $Zp3-Cre^{+/-}Rad51^{fl/fl}$ e fêmeas $Zp3-Cre^{-/-}Rad51^{fl/fl}$ (Figura 11).

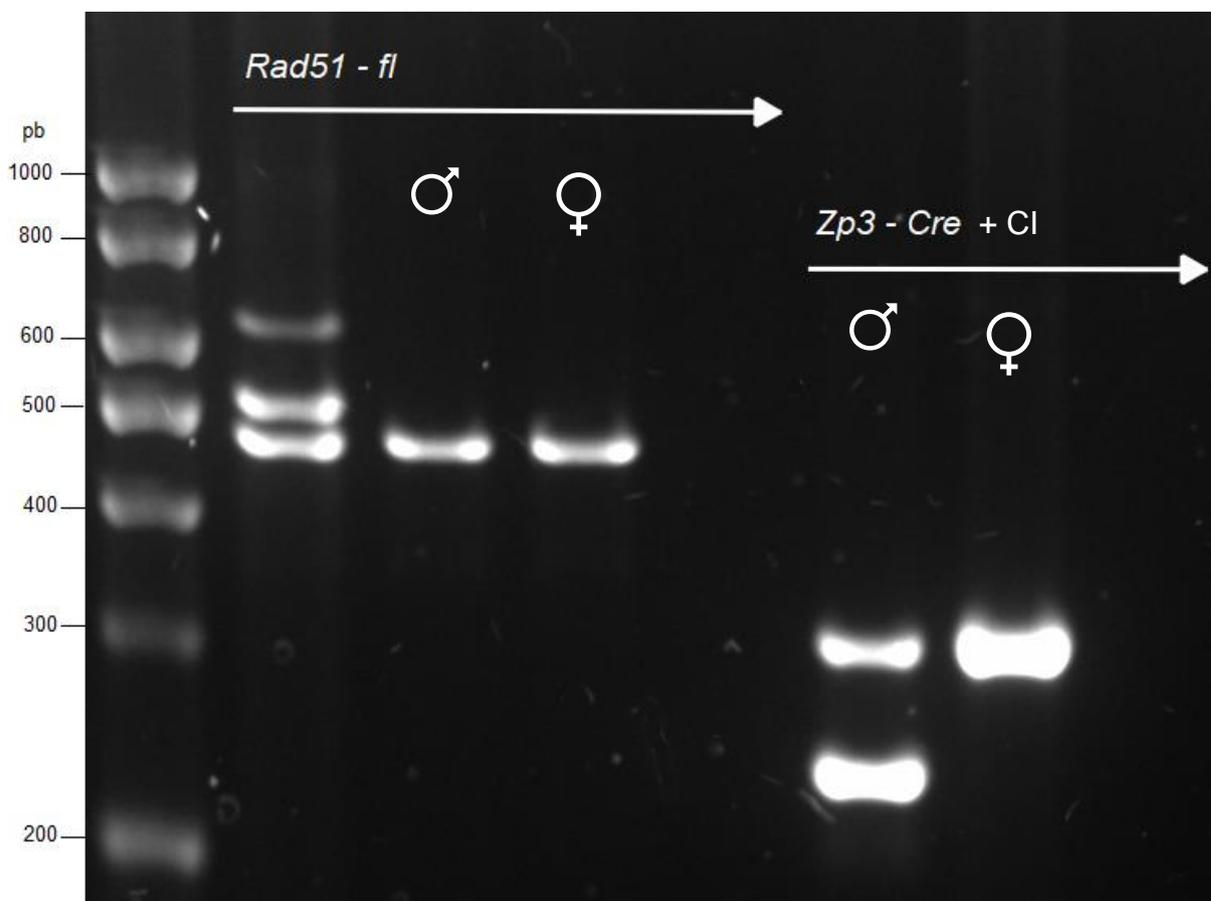


Figura 11: gel de agarose evidenciando o genótipo das matrizes do modelo experimental.

A segunda coluna corresponde a um controle heterozigoto ($Rad51^{+/-}$). Os animais das matrizes experimentais apresentavam o $loxP$ em homozigose ($Rad51^{fl/fl}$). O transgene $Zp3-Cre$ foi amplificado em conjunto com o controle interno, sendo que a banda do $Zp3-Cre$ possui 262 pb, enquanto o controle interno apresentava 324 pb. O $Zp3-Cre$ foi selecionado apenas para os machos das matrizes (como ilustrado na figura), pois a sua presença nas fêmeas matrizes era indesejável.

Fonte: elaborada pelo autor.

A partir do acasalamento desses animais foram obtidas as fêmeas utilizadas nos experimentos e portadoras dos seguintes genótipos: WT ($Rad51^{fl/fl}$) – $Zp3-Cre^{-/-}Rad51^{fl/fl}$ e KO ($Rad51^{-/-}$) – $Zp3-Cre^{+/-}Rad51^{fl/fl}$ (Figura 12).

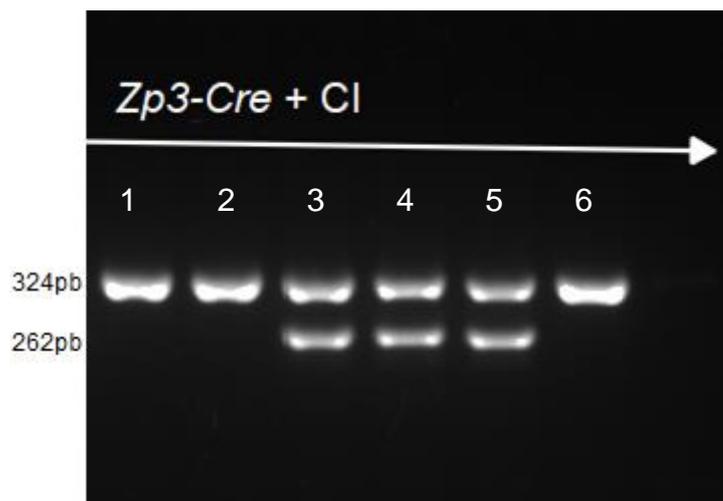


Figura 12: gel de genotipagem para *Zp3-Cre* de animais da progênie das matrizes experimentais. Pelo gel observa-se que 3 animais herdaram o *Zp3-Cre* (“3”, “4” e “5”, apresentando a banda de baixo), então as fêmeas apresentam o genótipo nocaute nos oócitos (*Rad51^{-/-}*). Os 3 demais (“1”, “2” e “6”) apresentam apenas a banda de cima, do controle interno, e possuem o genótipo selvagem nos oócitos. **Fonte:** elaborada pelo autor.

As fêmeas de genótipo *Zp3-Cre^{+/-}Rad51^{fl/fl}* foram consideradas KO uma vez que a presença do transgene *Zp3-Cre* resulta em expressão de *Cre-recombinase* no oócito, seguido por deleção da *Rad51* (e.g., *Rad51^{-/-}*).

As fêmeas KO apresentaram quadro de subfertilidade quando acasaladas com machos selvagens (*Rad51^{+/+}*). Os animais nascidos desses acasalamentos foram genotipados, em conjunto com a progênie de fêmeas do grupo selvagem (*Rad51^{fl/fl}*), para verificação da excisão do alelo *floxed* da *Rad51*. Para isso, foi utilizado um primer que flanqueia as sequências *floxed*. Como resultado, 100% da progênie das fêmeas selvagens apresentou genótipo *Rad51^{fl/+}*, sendo o alelo *floxed* oriundo do oócito e o selvagem oriundo do espermatozoide. Em comparação, a progênie das fêmeas KO apresentou genótipo *Rad51^{-/+}*, sendo o alelo excisado oriundo do oócito e o alelo selvagem natural do espermatozoide (Figura 13).

Para tentativa de identificar o momento do bloqueio embrionário que caracteriza as fêmeas KO como subférteis, foram coletados botões embrionários de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* no dia 8,5 pós-coito (n = 2 fêmeas de cada grupo); enquanto que nas fêmeas *Rad51^{fl/fl}* foram observados 9 botões embrionários, todos contendo feto em desenvolvimento, nas fêmeas *Rad51^{-/-}* foram encontrados 4 fetos em reabsorção, indicando que ocorre bloqueio em momento anterior.

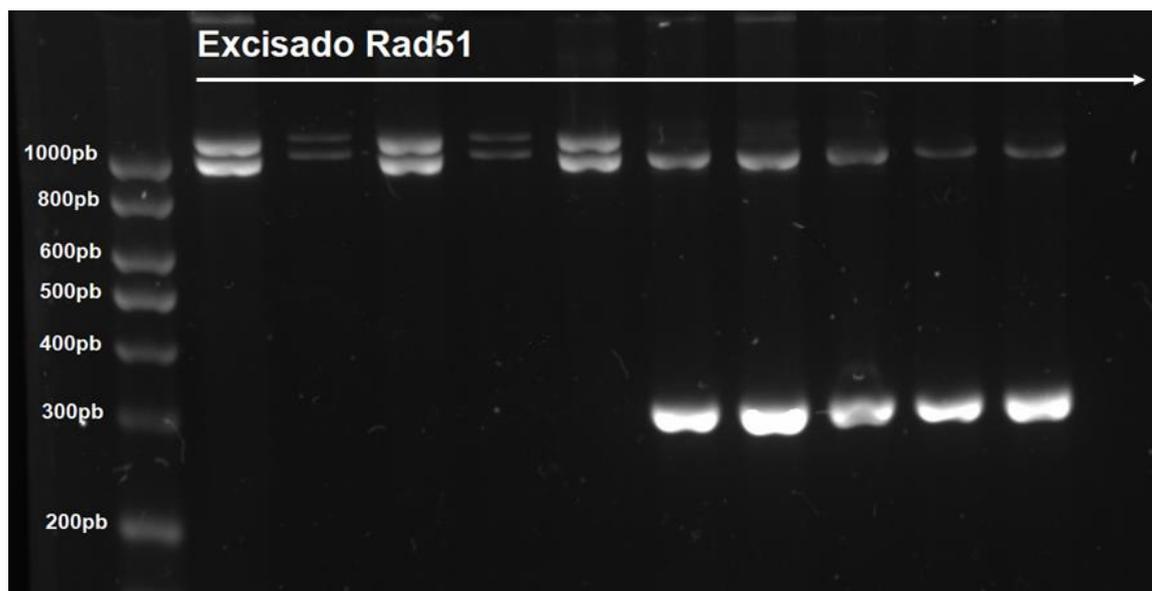


Figura 13: gel de genotipagem com o primer excisado Rad51.

Foram analisados 5 animais da progênie de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* ("1 - 5") e 5 animais da progênie de fêmeas *Rad51^{-/-}* ("6 - 10"). Como mostrado, a progênie de fêmeas KO apresentou a banda correspondente ao alelo excisado (322 pb), enquanto que esta não estava presente na progênie de fêmeas *Rad51^{fl/fl}*.

Fonte: elaborada pelo autor.

A banda correspondente ao fragmento excisado da *Rad51* foi sequenciada (sequenciamento Sanger) para confirmação do genótipo. O alinhamento da sequência obtida (utilizando como referência do genoma do *Mus musculus*) confirmou a excisão da região flanqueada pelos sítios *loxP* (exon 4 - fragmento de 7,7 kb) (Figura 14).

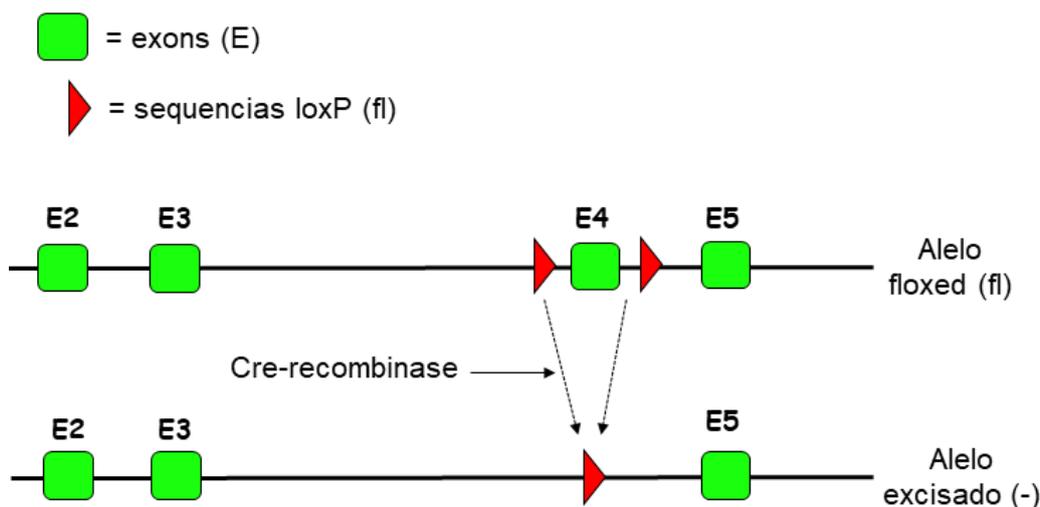


Figura 14: representação esquemática do alelo *Rad51* floxed excisado pela *Cre-recombinase*.

O exon 4 (E4) do gene *Rad51* foi flanqueado por sequências *loxP* (fl), região reconhecida e recombinada pela *Cre-recombinase*.

Fonte: adaptado de Frappart, PO.

6.2. VALIDAÇÃO DO MODELO ANIMAL

É esperado que fêmeas *Zp3-CRE^{+/-}:Rad51^{fl/fl}* não expressem RAD51 nos oócitos; a expressão de *Cre-recombinase* exclusivamente nos oócitos de folículos primários-secundários deve resultar na excisão do exon 4 (flanqueado por sequências floxed) no gene *Rad51*. Para confirmação desse resultado, oócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa (GV) foram coletados de fêmeas *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* com três semanas de idade, após estímulo com eCG. Foi utilizado qPCR para análise da expressão de *Rad51* em quintuplicada por grupo experimental, sendo cada amostra composta por pool de 15 oócitos. Como esperado, a expressão de *Rad51* apresentou-se diminuída (em 17 vezes, $P < 0,0001$) nos oócitos *Rad51^{-/-}* ($0,0494 \pm 0,0079$) em relação aos *Rad51^{fl/fl}* ($0,8399 \pm 0,0137$). Por outro lado, a expressão de *Rad51* não se mostrou alterada nas células do cumulus, o que indica que a deleção de *Rad51* se restringiu ao oócito (Figura 15). Esse resultado foi em seguida confirmado por western blot utilizando pool de 200 oócitos/amostra (Figura 16).

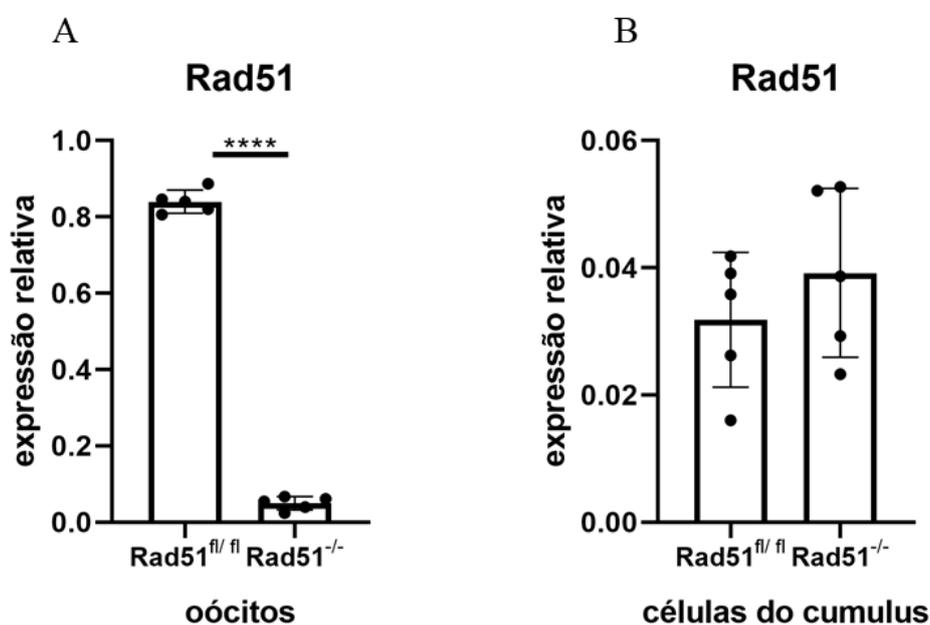


Figura 15: validação da deficiência oócito-específica de RAD51.

(A): É observado a depleção da expressão de *Rad51* nos oócitos *Rad51^{-/-}*, apresentando média $0,0494 \pm 0,0079$; contra $0,8399 \pm 0,0137$ em oócitos *Rad51^{fl/fl}*. (B): A expressão nas células do cumulus permaneceu inalterada, com média de $0,0318 \pm 0,0047$ nas células do cumulus de oócitos *Rad51^{fl/fl}* e $0,0392 \pm 0,0059$ nas células do cumulus de oócitos *Rad51^{-/-}*, confirmando o modelo KO oócito-específico.

**** $P < 0,0001$.

Fonte: elaborada pelo autor.

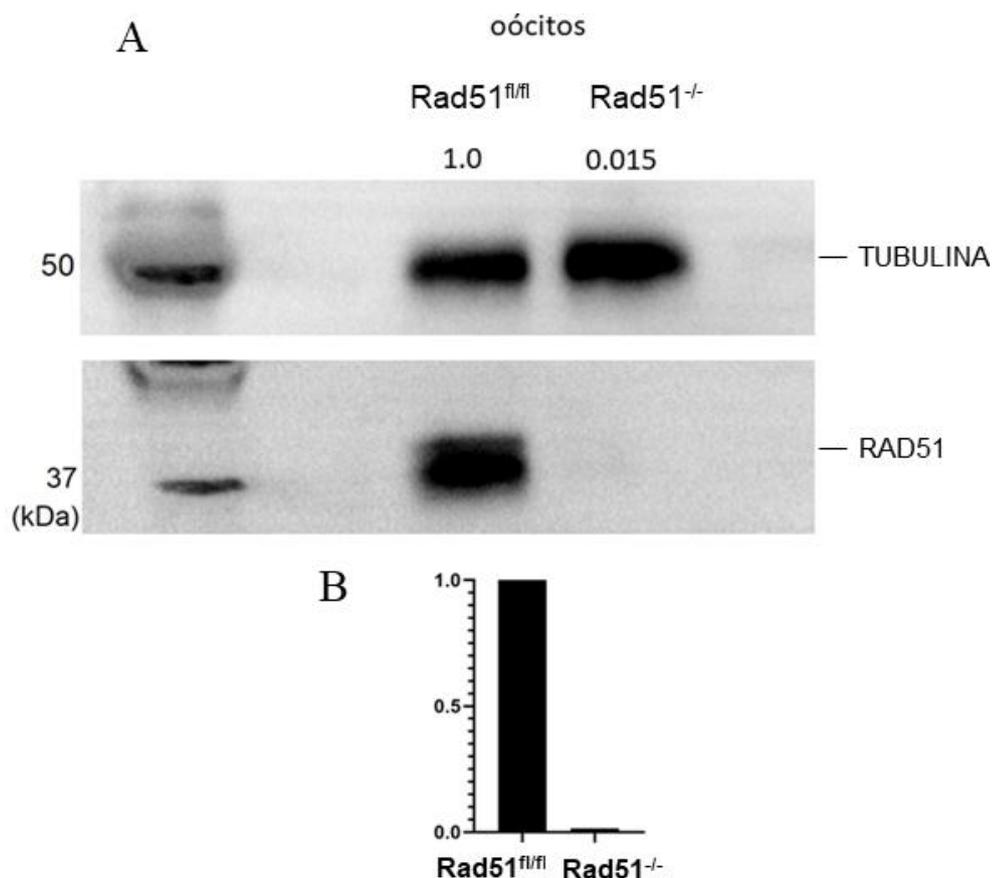


Figura 16: Western Blot de oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*.

(A): Membrana de western blot mostrando a marcação para TUBA1A (52 kDa) e RAD51 (37 kDa): primeira coluna = ladder; segunda coluna = 200 oócitos selvagens; terceira coluna = 200 oócitos nocaute. (B): quantificação do nível de proteína RAD51 nos oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*, normalizado pela intensidade da banda da marcação endógena.

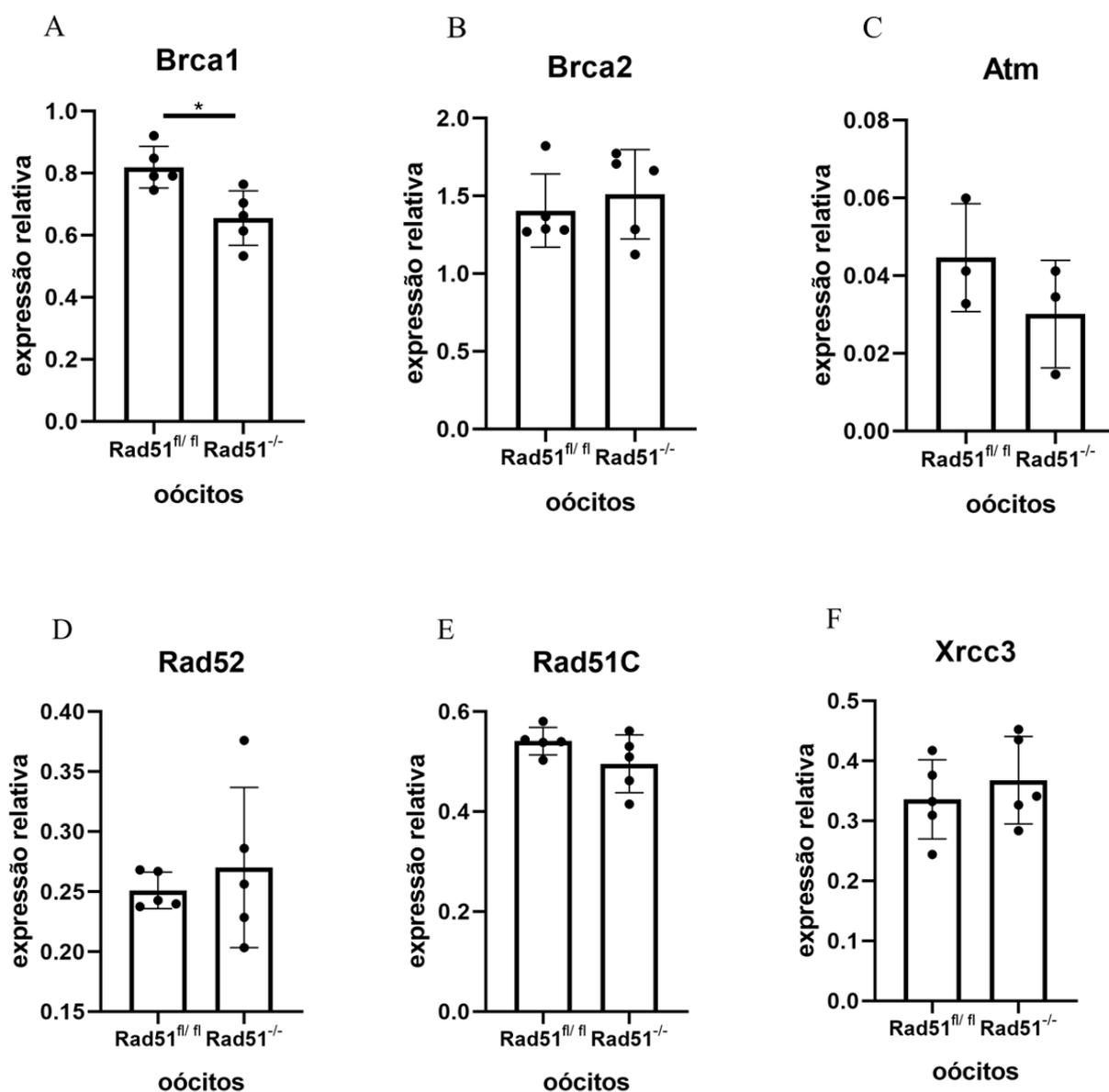
Fonte: elaborada pelo autor.

6.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Com o intuito de avaliar possíveis alterações na expressão de genes relacionados à via de reparo de DSBs por HR, os seguintes alvos tiveram sua expressão determinada por qPCR utilizando pools de 15 oócitos em quintuplicata: *Rad51c*, *Xrcc3*, *Rad52*, *Atm*, *Brca1* e *Brca2*. Como resultado, não foi observada diferença entre oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* quanto a expressão dos genes analisados (Figura 17: B - H). Somente os transcritos codificados pelo gene *Brca1* apresentaram-se diminuídos em ~1,2 vezes ($P = 0,01$) nos oócitos *Rad51^{-/-}* (Figura 17 - A).

Também avaliamos nos oócitos a expressão de fatores de crescimento e comunicação com as células da granulosa, os quais são essenciais para o desenvolvimento do gameta e regulação da foliculogênese: *Cdh1*, *Gdf9*, *Bmp15* e

Fgf8b. No entanto, não encontramos nenhuma alteração na expressão desses genes (Figura 17: I - L). Por fim, avaliamos nas células do cumulus a expressão de genes-chave para a foliculogênese (*Kitl*, *Fshr*, *Inhba* e *Inhbb*), porém esses também não se mostraram alterados entre os grupos (Figura 18).



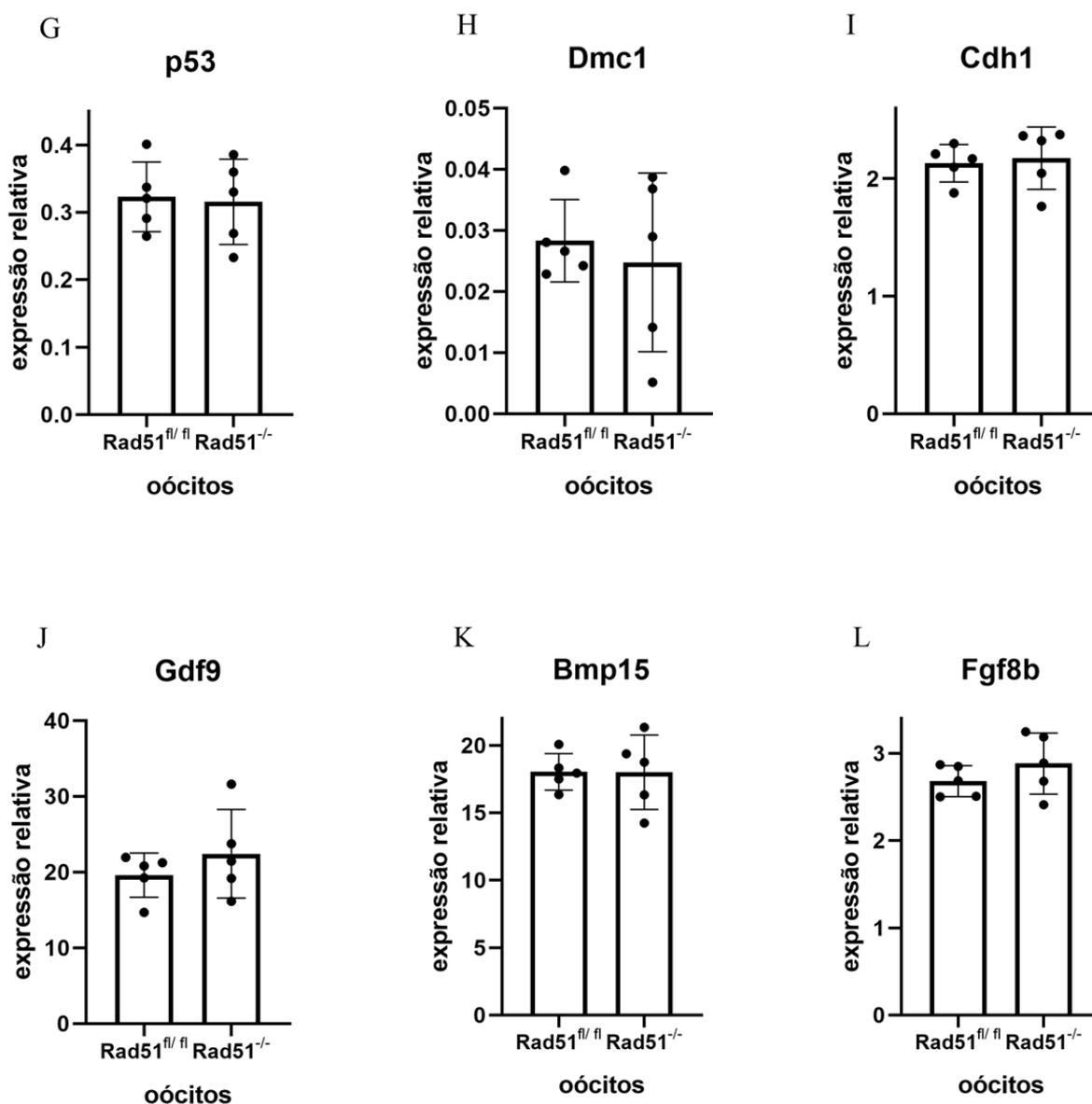


Figura 17: expressão relativa dos genes analisados nos oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*.

(A): A expressão de *Brca1* mostrou-se reduzida em oócitos *Rad51^{-/-}* (média $0,82 \pm 0,03$) em 1,25 vezes ($P = 0,01$) em relação aos oócitos *Rad51^{fl/fl}* ($0,655 \pm 0,039$). (B): Transcritos do gene *Brca2*: média dos oócitos *Rad51^{fl/fl}* = $1,4 \pm 0,1$; média dos oócitos *Rad51^{-/-}* = $1,5 \pm 0,1$; $P = 0,84$. (C): Transcritos do gene *Atm*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,045 \pm 0,008$; *Rad51^{-/-}* = $0,030 \pm 0,008$; $P = 0,27$. (D): Transcritos do gene *Rad52*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,250 \pm 0,007$; *Rad51^{-/-}* = $0,270 \pm 0,029$; $P = 0,56$. (E): Transcritos do gene *Rad51C*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,54 \pm 0,01$; *Rad51^{-/-}* = $0,49 \pm 0,02$; $P = 0,15$. (F): Transcritos do gene *Xrcc3*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,336 \pm 0,029$; *Rad51^{-/-}* = $0,368 \pm 0,032$; $P = 0,5$. (G): Transcritos do gene *p53*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,32 \pm 0,02$; *Rad51^{-/-}* = $0,31 \pm 0,03$; $P = 0,84$. (H): Transcritos do gene *Dmc1*: *Rad51^{fl/fl}* = $0,028 \pm 0,003$; *Rad51^{-/-}* = $0,025 \pm 0,006$; $P = 0,63$. (I): Transcritos do gene *Cdh1*: *Rad51^{fl/fl}* = $2,13 \pm 0,07$; *Rad51^{-/-}* = $2,17 \pm 0,12$; $P = 0,76$. (J): Transcritos do gene *Gdf9*: *Rad51^{fl/fl}* = $19,6 \pm 1,3$; *Rad51^{-/-}* = $22,4 \pm 2,6$; $P = 0,36$. (K): Transcritos do gene *Bmp15*: *Rad51^{fl/fl}* = $18,0 \pm 0,6$; *Rad51^{-/-}* = $18,0 \pm 1,2$; $P = 0,98$. (L): Transcritos do gene *Fgf8b*: *Rad51^{fl/fl}* = $2,68 \pm 0,08$; *Rad51^{-/-}* = $2,88 \pm 0,15$; $P = 0,28$.

* $P < 0,05$.

Fonte: elaborada pelo autor.

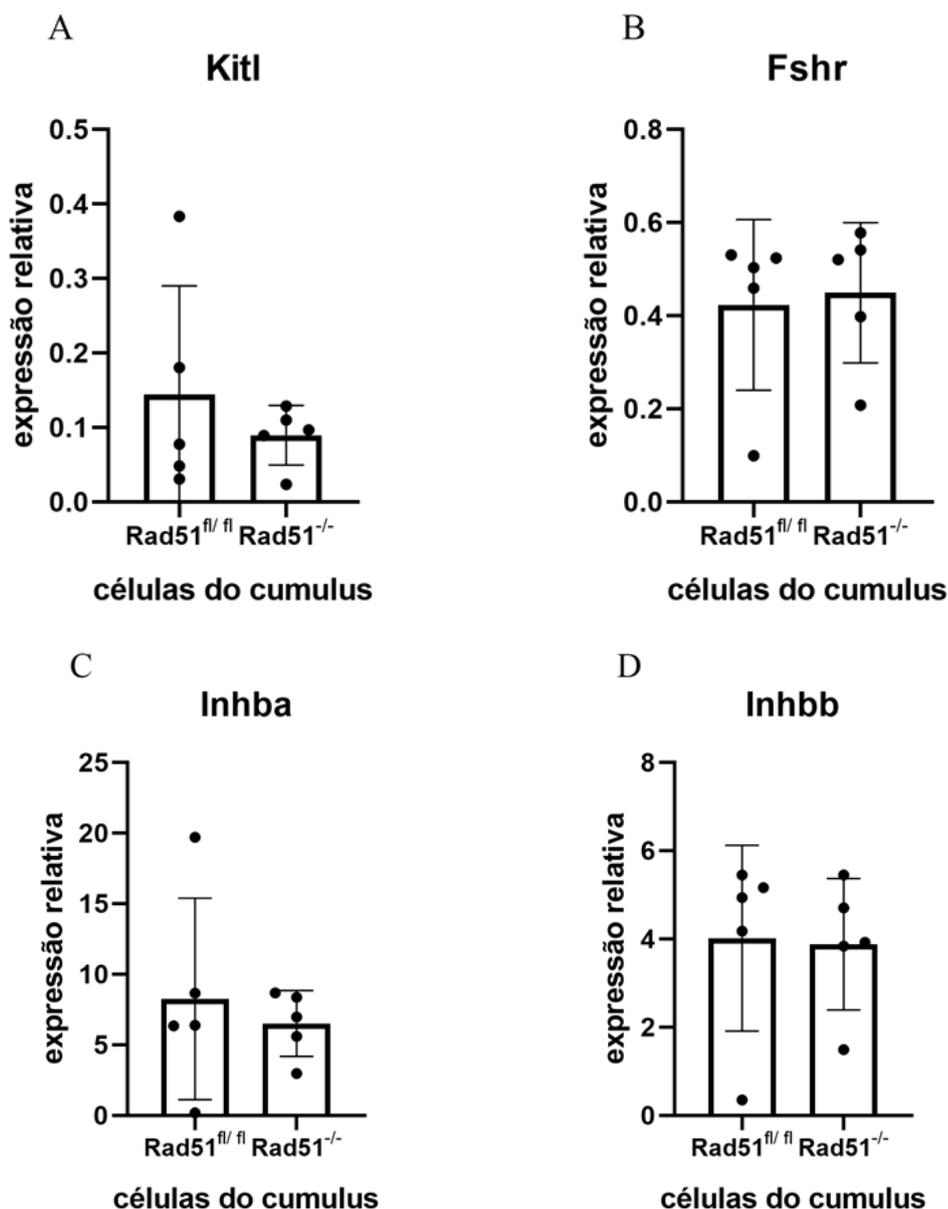


Figura 18: expressão relativa dos genes analisados nas células do cumulus provenientes de oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*.

(A): *Kitl*: *Rad51^{fl/fl}* = 0,14 ± 0,06; *Rad51^{-/-}* = 0,09 ± 0,02; P = 0,45. (B): *Fshr*: *Rad51^{fl/fl}* = 0,42 ± 0,08; *Rad51^{-/-}* = 0,45 ± 0,07; P = 0,69. (C): *Inhba*: *Rad51^{fl/fl}* = 8,2 ± 3,2; *Rad51^{-/-}* = 6,5 ± 1,0; P = 0,62. (D): *Inhbb*: *Rad51^{fl/fl}* = 4,0 ± 0,9; *Rad51^{-/-}* = 3,9 ± 0,7; P = 0,55.

Fonte: elaborada pelo autor.

6.4. MICROSCOPIA CONFOCAL – NUCLÉOLO

Dados da literatura (DEBEY et al., 1993) apontam que oócitos com cromatina do tipo Surrounded Nucleolus (SN) apresentam maior competência de desenvolvimento do que os classificados como Non-Surrounded Nucleolus (NSN).

Assim, determinamos a conformação da cromatina dos oócitos em estágio de GV (Figura 19) na tentativa de caracterizar um possível efeito da deficiência de RAD51. No entanto, oócitos *Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}* de fêmeas com 3 semanas não diferiram quanto a configuração da cromatina ($P = 0,24$), com porcentagem de SN igual a 58,3% e 42,4%, respectivamente.

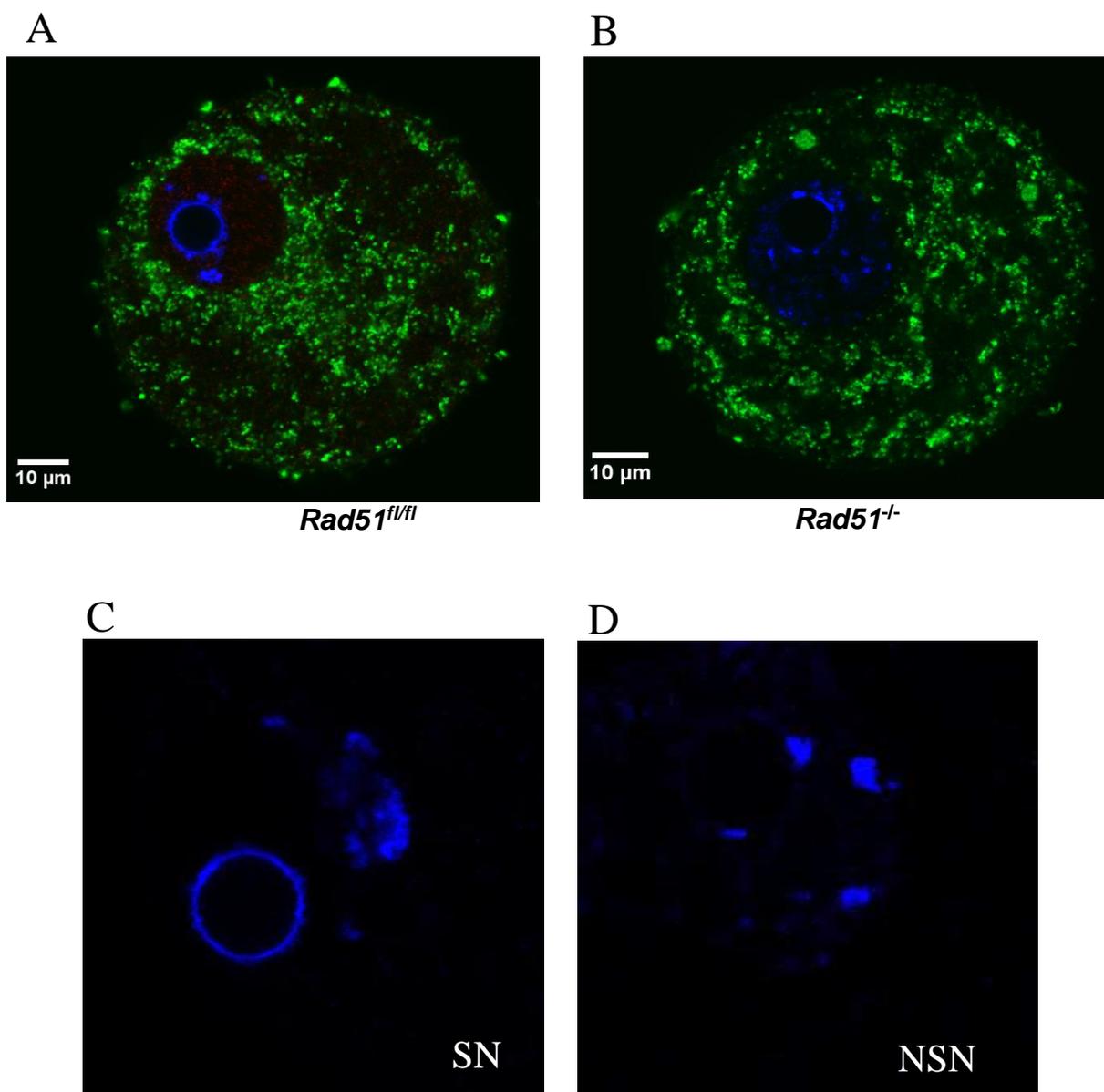


Figura 19: oócitos analisados em microscopia confocal para conformação da cromatina. Verde: mitocôndrias, vermelho: RAD51 e azul: cromatina. (A): oócito representando o grupo WT. (B): oócito representando o grupo *Rad51^{-/-}*. (C): representação de cromatina classificada como SN. (D): representação de cromatina classificada como NSN.
Fonte: elaborada pelo autor.

6.5. OVULAÇÃO – EXTRUSÃO DO PB1 E ORGANIZAÇÃO DA PLACA METAFÁSICA

A seguir, fêmeas *Rad51*^{-/-} foram avaliadas quanto a taxa de ovulação e organização da placa metafásica. Anteriormente, já havíamos verificado que a taxa de ovulação de oócitos com primeiro corpúsculo polar (PB1) não difere entre fêmeas *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} com três semanas de idade (consideradas pré-púberes). Visto que os acasalamentos para análise da fertilidade foram realizados com fêmeas de oito ou mais semanas (púberes), a taxa de ovulação foi determinada utilizando dessa vez fêmeas com 8 semanas de idade. Mais uma vez, não foi observado efeito da deficiência de RAD51 sobre a taxa de ovulação ($P = 0,82$): animais *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} ovularam, respectivamente, $24,8 \pm 3,81$ e $25,1 \pm 3,18$ oócitos com PB1 por fêmea (Figura 20).

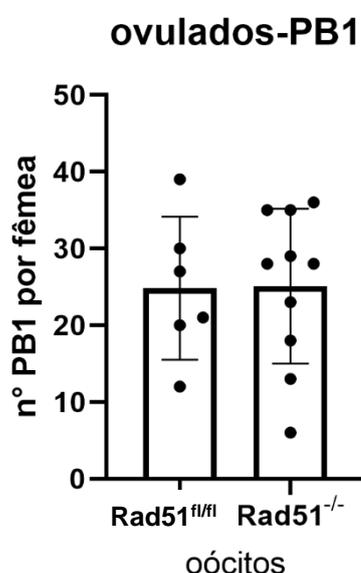


Figura 20: número de oócitos ovulados.
Oócitos ovulados com PB1 por fêmea *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-}.
Fonte: elaborada pelo autor.

Uma vez que um possível defeito na disjunção cromossômica poderia explicar o impacto sobre a fertilidade, os oócitos ovulados com PB1 também foram avaliados quanto a organização da placa metafásica. Para isso, os mesmos foram processados para imunofluorescência utilizando anticorpo reativo à TUBA1A (tubulina) e marcação

da cromatina utilizando Hoechst 33342. Foram analisados em microscópio confocal 64 oócitos de cada genótipo (*Rad51^{fl/fl}* e *Rad51^{-/-}*), provenientes de 4 animais de cada grupo. Desses, 30 (47%) oócitos *Rad51^{fl/fl}* e 26 (41%) *Rad51^{-/-}* apresentaram organização normal do fuso meiótico (Figura 21; $P = 0,48$); a maioria dos demais oócitos não apresentou o fuso meiótico no plano focal analisado, impossibilitando uma análise fidedigna. Este resultado sugere que a subfertilidade de fêmeas *Rad51^{-/-}* não é explicada por erros na disjunção cromossômica durante a meiose.

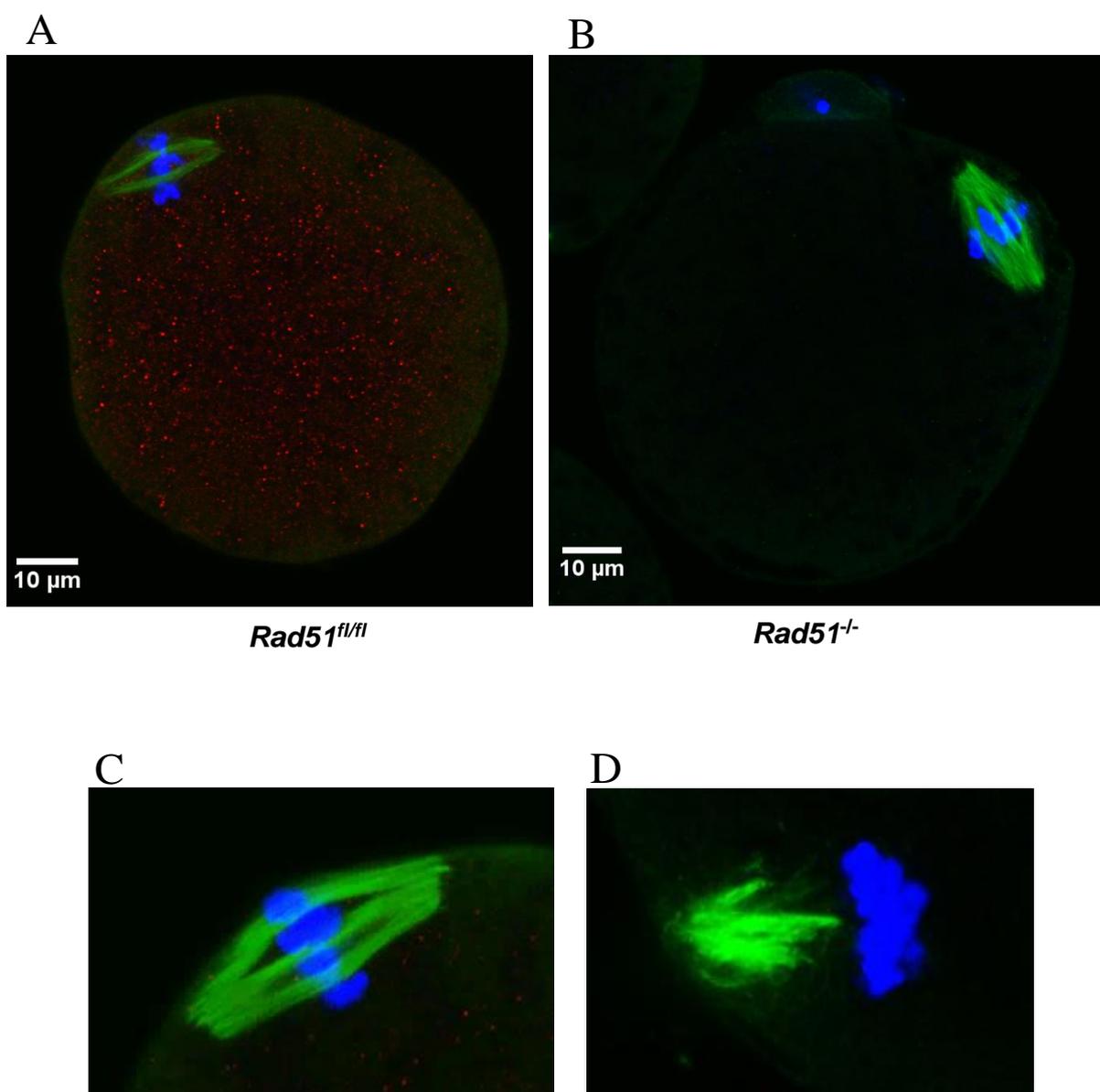


Figura 21: oócitos analisados em microscopia confocal para conformação do fuso meiótico. Verde: TUBULINA, vermelho: RAD51 e azul: cromossomos metafásicos. (A): oócito representando o grupo *Rad51^{fl/fl}*. (B): oócito representando o grupo *Rad51^{-/-}*. (C): Representação da placa metafásica classificada como normal. (D): Representação da placa metafásica classificada como amórfica.

Fonte: elaborada pelo autor.

6.6. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA

Na literatura, a RAD51 é fortemente associada à replicação e manutenção do número de cópias de mtDNA (SAGE; KNIGHT, 2013). A RAD51 também é associada à manutenção da função mitocondrial durante maturação *in vitro* de oócitos murinos (KIM et al., 2016). A fim de investigar o impacto da deleção de *Rad51* sobre a estabilidade do mtDNA, oócitos ovulados em estágio de metáfase II (identificados com base na presença do primeiro corpúsculo polar – PB1) foram coletados de fêmeas WT e *Rad51*^{-/-} após estímulo com eCG e hCG. A análise individual desses oócitos utilizando qPCR indicou nível semelhante (P = 0,15) de cópias de mtDNA entre os oócitos dos dois grupos: *Rad51*^{fl/fl} – 306756 ± 15914 e *Rad51*^{-/-} – 334706 ± 11589 (Figura 22).

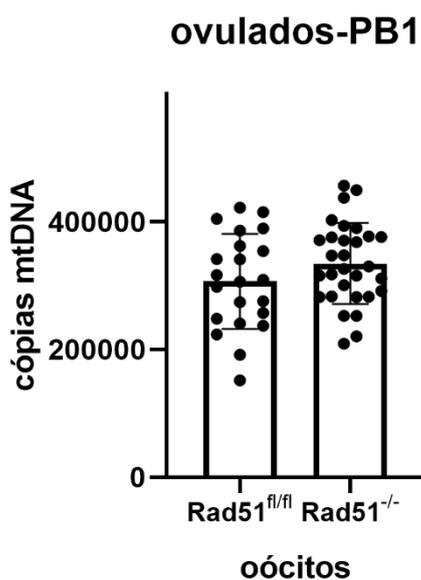


Figura 22: número de cópias de mtDNA – oócitos ovulados.

Número de cópias mensuradas em oócitos ovulados dos grupos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} com o primer MT14/15 (amplificação de parte dos genes *mt-Tq*, *mt-Tm* e *mt-Nd2*). N=22 oócitos *Rad51*^{fl/fl} e 30 oócitos *Rad51*^{-/-}. P = 0,15.

Fonte: elaborada pelo autor.

Em acordo com o resultado acima, oócitos imaturos em estágio de GV também apresentaram nível similar (P = 0,69) de mtDNA entre os grupos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} (Figura 23). Esse resultado também foi confirmado (P = 0,19) por uso de um conjunto alternativo de primers com anelamento em outra posição na molécula de mtDNA (Figura 23 - B).

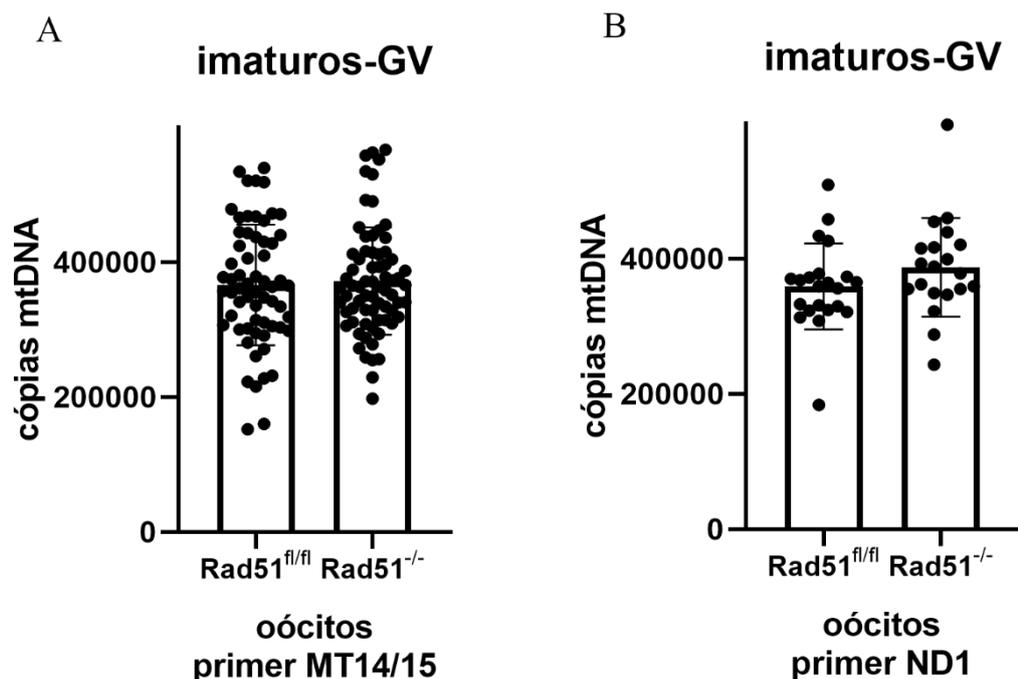


Figura 23: número de cópias de mtDNA – oócitos imatuross.

Número de cópias mensuradas em oócitos imatuross dos grupos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-}.

(A): Primer MT14/15: N = 62 oócitos *Rad51*^{fl/fl} (média 366223 ± 113633 cópiass) e 71 oócitos *Rad51*^{-/-} (371931 ± 9450 cópiass), P = 0,69.

(B): Primer ND1 (sobre o gene *mt-Nd1*): N = 22 oócitos *Rad51*^{fl/fl} (359144 ± 13573) e 20 oócitos *Rad51*^{-/-} (387219 ± 16338 cópiass), P = 0,19.

Fonte: elaborada pelo autor.

Também foi analisado o número de cópiass de mtDNA no fígado de animais da progênie de fêmeass WT e KO, resultante do acasalamento com machos selvagens. Como resultado, animais nascidos de oócitos *Rad51*^{-/-} não apresentaram diferença no número de cópiass de mtDNA no fígado (2182 ± 268), em relação aos animais nascidos do grupo selvagem (2270 ± 252), P = 0,82. (Figura 24).

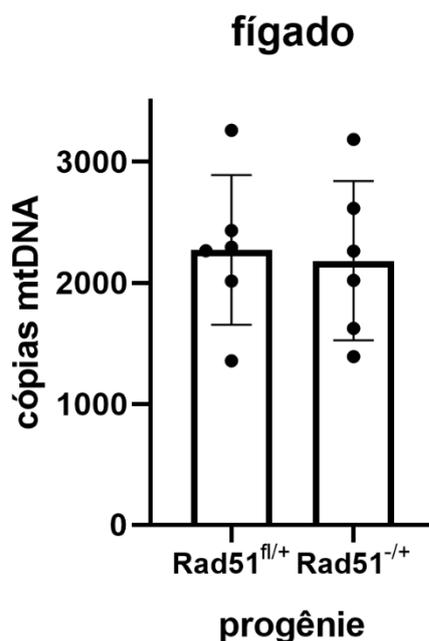


Figura 24: número de cópias de mtDNA em fígado.

Número de cópias de mtDNA mensuradas em fígado de animais da progênie de fêmeas WT e KO, coletados na terceira semana de idade.

Fonte: elaborada pelo autor.

7. DISCUSSÕES

Em 1996, foram produzidos os primeiros embriões murinos *Rad51*^{-/-} por meio do acasalamento de machos e fêmeas com genótipo *Rad51*^{+/-} (TSUZUKI et al., 1996 & LIM; HASTY, 1996). Como resultado, verificou-se a letalidade da deficiência de RAD51 sobre a embriogênese. Enquanto Tsuzuki et al. encontraram que o desenvolvimento de embriões *Rad51*^{-/-} bloqueia durante os primeiros estádios da pré-implantação, Lim et al. reportaram que o bloqueio ocorre no início da pós-implantação. De acordo com os autores, esse efeito letal é explicado pelo impacto da deficiência de RAD51 sobre a proliferação celular, instabilidade cromossômica e apoptose. Em comparação, o presente trabalho revelou que a RAD51 não é essencial para o desenvolvimento do oócito.

Em um estudo paralelo do nosso grupo, foi constatado que fêmeas portadoras de oócitos *Rad51*^{-/-} são subférteis. O acasalamento de fêmeas *Rad51*^{-/-} com machos selvagens resultou no nascimento de ~2,8 filhotes/ninhada, comparado com ~8,8 filhotes/ninhada no grupo controle. Uma vez que esse resultado inesperado poderia

ser explicado por um problema com o modelo animal utilizado, nós determinamos por qPCR os níveis de *Rad51* no oócito. Embora níveis residuais de transcritos ainda estivessem presentes em oócitos crescidos (em estágio de GV), encontramos que a *Rad51* estava diminuída em ~17 vezes em comparação com oócitos selvagens. Ademais, a análise por western blot e imunofluorescência confirmou esse resultado uma vez que não foram encontrados resquícios da proteína RAD51 nos oócitos. Por outro lado, consideramos a hipótese de que a presença de oócitos residuais em *Rad51* poderia explicar o desenvolvimento a termo nas fêmeas *Rad51*^{-/-}. No entanto, enquanto os níveis de transcrito *Rad51* variaram nos oócitos selvagens de ~0,79 a ~0,89 (expressos em relação a média geométrica de *Rps18* e *Rpl19*), os níveis de *Rad51* variaram nos oócitos nocautes de ~0,02 a ~0,07 (~44 a 11 vezes menos do que nos oócitos selvagens). Por fim, a genotipagem e sequenciamento da progênie oriunda de fêmeas *Rad51*^{-/-} indicou a presença do alelo excisado em 100% dos filhotes amostrados. Portanto, esses resultados confirmam que a deficiência de RAD51 no oócito é compatível com o desenvolvimento a termo.

Em busca de prováveis alterações no desenvolvimento do oócito que pudessem explicar a subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-}, nós avaliamos oócitos crescidos quanto a organização da cromatina. A competência oocitária para maturação e posterior desenvolvimento embrionário tem sido relacionada à configuração da cromatina do oócito crescido, onde aqueles que atingem o estágio SN apresentam maior capacidade para progressão da meiose (DEBEY et al., 1993)(BOUNIOL-BALY et al., 1999). Para avaliar a organização da cromatina de oócitos crescidos (em estágio de GV) coletados de folículos antrais após estímulo de eCG, foram analisados os halos da cromatina por coloração com Hoechst e visualização em microscópio confocal. No entanto, oócitos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} apresentaram proporções semelhantes de configurações SN e NSN, não indicando efeito do nocaute sobre o crescimento oocitário.

Proteínas da via de reparo de DSBs como RAD51, RAD51C, XRCC3 e MRE11 vêm sendo descritas como presentes na mitocôndria (SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2010)(DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011). Em (SAGE, 2013), por exemplo foi relatado que a RAD51 é importada para a mitocôndria sob estresse replicativo e oxidativo, e que a sua presença na organela contribui com a síntese de mtDNA. Além da RAD51; MRE11, RAD51C e XRCC3 também foram associadas à replicação do

mtDNA e manutenção da sua integridade sob condição de estresse replicativo (MISHRA; SAXENA; KAUSHAL, 2018). Uma vez que a subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-} poderia ser explicada por um impacto sobre a estabilidade do mtDNA, os níveis deste foram analisados nos oócitos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-}. Em nosso modelo, o nocaute ocorre no início da foliculogênese, período no qual observa-se intensa replicação de mtDNA no oócito. Assim, era esperado que a deficiência de RAD51 resultasse em oócitos com menos cópias de mtDNA. No entanto, tanto oócitos *Rad51*^{-/-} crescidos como ovulados não apresentaram diferença no conteúdo de mtDNA em relação a oócitos selvagens. Mesmo a análise no tecido hepático da progênie não indicou diferença entre os grupos *Rad51*^{-/-} e *Rad51*^{fl/fl}. Esse resultado está em consonância com outros resultados do nosso grupo que mostram que oócitos *Rad51*^{-/-} apresentam função mitocondrial normal. Em comparação, a depleção de *Rad51* por RNAi durante a maturação *in vitro* resultou em evidente disfunção mitocondrial (KIM et al., 2016). É possível, no entanto, que essas diferenças sejam explicadas pelo efeito mais agudo do RNAi em comparação com o nosso modelo de nocaute condicional. Por exemplo, um possível aumento na expressão de *Mre11*, *Rad51c* e *Xrcc3* poderia ter compensado o efeito da deleção de *Rad51* sobre a mitocôndria.

Uma vez que o desenvolvimento normal de oócitos *Rad51*^{-/-} poderia ser explicado por alteração na expressão de genes codificantes para a maquinaria de HR, os níveis transcricionais de vários destes foram investigados no oócito. Como resultado, encontramos que, exceto pela *Brca1*, todos os demais genes avaliados não diferiram entre oócitos *Rad51*^{-/-} e *Rad51*^{fl/fl}. Também não encontramos diferença na expressão de genes envolvidos com a competência oocitária (e.g., *Gdf9*, *Bmp15*, *Fgf8b* e *Cdh1*) e com a diferenciação das células da granulosa (e.g., *Inhba*, *Inhbb*, *Fshr* e *Kitl*). Esses resultados corroboram, portanto, nosso achado de que a RAD51 não é essencial para o desenvolvimento do oócito. Por outro lado, é possível que a diminuição de *Brca1* tenha contribuído com a subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-}. A BRCA1 é necessária para o recrutamento de RAD51 no local da DSB através de interação com BRCA2 (SCULLY et al., 1997 & ROY; CHUN; POWELL, 2012). Em Titus et al. 2013, foi demonstrado que DSBs acumulam em oócitos murinos e humanos com o envelhecimento, e que a expressão de genes da via de reparo de DSBs (e.g., *Atm*, *Mre11*, *Rad51* e *Brca1*) é reduzida em oócitos envelhecidos. Além disso, a inibição da expressão desses genes por RNAi em oócitos murinos resultou em

impacto sobre a viabilidade oocitária, o que também é visto em mulheres com mutação em *BRCA1*.

Uma vez que não encontramos evidência de efeito do nocaute de *Rad51* sobre o desenvolvimento do oócito, nós em seguida investigamos a organização do fuso meiótico de oócitos *Rad51*^{-/-}. Animais deficientes em RAD51C, paróloga da RAD51, apresentam falha na ovulação, a qual é revertida por uso de gonadotrofinas. Porém, mesmo com o resgate da ovulação, a deficiência de RAD51C resulta em alinhamento anormal dos cromossomos no fuso meiótico e separação precoce das cromátides irmãs, culminando em aneuploidias e bloqueio embrionário (KUZNETSOV et al., 2007). Em comparação, o número de oócitos com PB1 não foi afetado pela deficiência de RAD51. Ademais, esses oócitos não apresentaram diferença em relação ao controle selvagem quanto a organização do fuso meiótico. A correta morfologia do fuso reflete a capacidade do oócito em completar a meiose e segregar corretamente seus cromossomos (TILIA et al., 2020). Erros na disjunção cromossômica se tornam mais comuns com o envelhecimento em oócitos de mulheres e fêmeas murinas, o que parece estar associado a deficiência na expressão de genes da maquinaria de HR como a *Rad51* (TITUS et al., 2013 & SELESNIEMI et al., 2011).

Considerando a ausência de efeito sobre o crescimento do oócito, a ovulação e a organização do fuso meiótico, concluímos que a RAD51 é dispensável para o desenvolvimento do oócito durante o período de folículo primário até a ovulação. Essa conclusão está em acordo com outros trabalhos que revelaram a grande tolerância do oócito a erros meióticos. Isso é explicado pela baixa capacidade do oócito em ativar vias de checkpoints, permitindo que o gameta progrida na meiose mesmo na presença de DSBs (NIE et al., 2017). Ma et al. (MA et al., 2019), por exemplo, demonstraram que a inibição de RAD51 melhora a taxa de extrusão de PB1 após a indução de DSBs. Isso é justificado pela ação da RAD51 em promover o reparo por homologia. Como resultado da ação de RAD51, há formação de junções Holliday, as quais, se não resolvidas, prejudicam a disjunção cromossômica durante a progressão da meiose. Por outro lado, DSBs não reparadas no oócito têm o potencial de afetar o embrião inicial. De fato, resultados preliminares nossos indicam que essa subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-} é determinada por bloqueio no desenvolvimento antes da pós-implantação; fêmeas *Rad51*^{-/-} apresentaram 04 fetos em reabsorção no dia 8,5 pós-coito, comparado com 09 fetos com desenvolvimento normal em fêmeas selvagens.

Considerando a essencialidade da RAD51 para a embriogênese inicial, é possível que a subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-} seja explicada pela variação entre embriões quanto ao momento da ativação do genoma embrionário. Mais especificamente, a transcrição precoce do alelo paterno de *Rad51* em somente uma minoria dos embriões poderia explicar o desenvolvimento a termo desses, mas não dos demais em que a transcrição de *Rad51* provavelmente ocorreria mais tardiamente.

Nas próximas etapas deste trabalho investigaremos se um possível bloqueio durante o desenvolvimento pré-implantacional é compatível com a subfertilidade de fêmeas *Rad51*^{-/-}. Caso isso se confirme, iremos também determinar os níveis transcricionais de *Rad51* nos embriões antes do bloqueio desenvolvimental. Oócitos imaturos também serão tratados com etoposide para indução de DSBs. Nosso objetivo com este último experimento é investigar associar a incidência de DSBs (por marcação de γ H2AX) com a presença de RAD51 no núcleo de oócitos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-}. Já a importação de RAD51 para a mitocôndria, e um possível impacto sobre o número de cópias de mtDNA, será estimulado por indução de estresse oxidativo utilizando glicose oxidase. Havendo evidência de enriquecimento mitocondrial de RAD51 após o tratamento, os oócitos tratados terão o mtDNA sequenciado como descrito por (CHINNERY et al., 2018). Por fim, o transcriptoma de oócitos *Rad51*^{fl/fl} e *Rad51*^{-/-} será determinado após a ovulação utilizando sequenciamento em larga escala de mRNA (RNAseq).

8. CONCLUSÕES

A RAD51 não é essencial para o desenvolvimento do oócito em murinos, e não apresentou efeito sobre a replicação do mtDNA do oócito na foliculogênese, em contraposição a trabalhos que associaram a RAD51 à replicação de mtDNA em tecidos somáticos. Assim, o fenótipo de subfertilidade não pode ser explicado pelo papel da RAD51 na replicação do mtDNA no oócito, nem tanto na resolução da meiose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171–179, 2010.
- ALBERTS;JOHNSON;LEWIS; RAFF; ROBERTS;WALTER. **Biologia Molecular da Celula**. [s.l: s.n.].
- BARRETT, S. L.; ALBERTINI, D. F. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 1, p. 29–39, 2010.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 238–245, 1 abr. 2007.
- BERRIDGE, M. V.; NEUZIL, J. The mobility of mitochondria: Intercellular trafficking in health and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. February, p. 15–20, 2017.
- 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.
- BISHOP, D. K. RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. **Cell**, v. 79, n. 6, p. 1081–1092, 1994.
- BORUM, K. Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. **Experimental Cell Research**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 1967.
- BOUNIOL-BALY, C. et al. Differential Transcriptional Activity Associated with Chromatin Configuration in Fully Grown Mouse Germinal Vesicle Oocytes1. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 3, p. 580–587, 1999.
- CARROLL, J.; MARANGOS, P. The DNA damage response in mammalian oocytes. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. JUN, p. 1–9, 2013.
- CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 52–64, 2016.
- CHEN, X. J. Mechanism of Homologous Recombination and Implications for Aging-Related Deletions in Mitochondrial DNA. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 476–496, 2013.
- CHIARATTI, M. R. et al. The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. **Cell Biology International**, n. February, p. 1–39, 2018.
- CHINNERY, V. I. et al. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 144–151, 2018.
- CHOI, Y.; RAJKOVIC, A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 5, p. 579–590, 2006.
- CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–22, 2018.
- COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, RÉ. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 799–808, 2012.
- CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, 2012.
- COTICCHIO, G. et al. Oocyte maturation: Gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 4, p. 427–454, 2014.
- DA SILVA-BUTTKUS, P. et al. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation

and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 23, p. 3890–3900, 2008.

DABOUSSI, F. et al. DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 12, p. 969–975, 2002.

DE LA FUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. **Developmental Biology**, v. 292, n. 1, p. 1–12, 2006.

DE VRIES, W. N. et al. 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. et al. 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.

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

DRIGGERS, W. J.; LEDOUX, S. P.; WILSON, G. L. Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 22042–22045, 1993.

FAN, W. et al. A Mouse Model of Mitochondrial Disease Reveals Germline Selection Against Severe mtDNA Mutations. v. 319, n. 5865, p. 958–962, 2011.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029–2074, 2013.

GARBER, J. C. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th. ed. Washington: The National Academies Press, 2011. v. 46

GINSBURG, M.; SNOW, M. H. L.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, n. 2, p. 521–528, 1990.

HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Ten Years After. **Molecular Cell**, v. 28, n. 5, p. 739–745, 2007.

HARTLERODE, A. J.; SCULLY, R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 423, n. 2, p. 157–168, 2009.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001.

HOLT, J. E.; LANE, S. I. R.; JONES, K. T. **The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 102

JIN, Z.-L.; KIM, N.-H. RAD51 maintains chromosome integrity and mitochondrial distribution during porcine oocyte maturation in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 5, 2017.

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

JOHNSON, R. D. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 13, p. 3398–3407, 2000.

JOSEPH SAMBROOK; DAVID W RUSSEL. **Sambrook & Russel - Molecular Cloning, A Laboratory Manual - Vol. 1, 2, 3 - 3rd edition - 2000 CSHL Press.pdf**. [s.l.: s.n.].

KAWABATA, M.; KAWABATA, T.; NISHIBORI, M. **Role of recA/RAD51 family proteins in mammals** *Acta Medica Okayama*, 2005.

KEZELE, P.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. [Frontiers in Bioscience 7, d1990-1996, September 1, 2002] CELL-CELL INTERACTIONS IN PRIMORDIAL FOLLICLE ASSEMBLY AND DEVELOPMENT Phillip Kezele, Eric Nilsson, and Michael K. Skinner. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1990–1996, 2002.

- KIM, K. H. et al. The role of Rad51 in safeguarding mitochondrial activity during the meiotic cell cycle in mammalian oocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–12, 2016.
- KNOWLES, B. B. et al. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes : A means to study maternal effect genes Expression of Cre Recombinase in Mouse Oocytes : A Means to Study Maternal Effect Genes. v. 112, n. March 2000, p. 110–112, 2016.
- KUZNETSOV, S. et al. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 5, p. 581–592, 2007.
- LAMARCHE, B. J.; ORAZIO, N. I.; WEITZMAN, M. D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3682–3695, 2010.
- LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 141–152, 2013.
- LIM, D. S.; HASTY, P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 12, p. 7133–7143, 1996.
- LIU, K. et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. **Current Biology**, v. 24, n. 21, p. 2501–2508, 2014.
- MA, J. Y. et al. The repair of endo/exogenous DNA double-strand breaks and its effects on meiotic chromosome segregation in oocytes. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 20, p. 3422–3430, 2019.
- MACABELLI, C. H. ET AL. 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, p. 1–13, 2014.
- MACHADO, T. S. et al. Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. e0133650, 2015.
- MACLENNAN, M. et al. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 45, p. 68–76, 2015.
- MAHROUS, E.; YANG, Q.; CLARKE, H. J. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 177–185, 2012.
- MAO, Z. et al. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. **DNA repair**, v. 7, n. 10, p. 1765–1771, 2009.
- MARANGOS, P. Chapter 9 Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Transcripts. **Oogenesis. Methods in Molecular Biology**, v. 1457, p. 209–215, 2016.
- MARANGOS, P.; CARROLL, J. Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. **Current Biology**, v. 22, n. 11, p. 989–994, 2012.
- MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 2009.
- MEYERS, D. E.; BASHA, H. I.; KOENIG, M. K. Mitochondrial cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis, and management. **Texas Heart Institute Journal**, v. 40, n. 4, p. 385–394, 2013.
- MISHRA, A.; SAXENA, S.; KAUSHAL, A. crossm Maintains Integrity of the Mitochondrial Genome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 38, n. 3, p. 1–18, 2018.
- NAGY, A. et al. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- NEGRITTO, M. C. **Repairing Double-Strand DNA Breaks**. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/repairing-double-strand-dna-breaks-14432332>>.
- NICKLAS, J. A. et al. Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 4, p. 313–320, 2004.

- NIE, Z. W. et al. Function and regulation mechanism of Chk1 during meiotic maturation in porcine oocytes. **Cell Cycle**, v. 16, n. 22, p. 2220–2229, 2017.
- NOGUEIRA, A. et al. RAD52 functions in homologous recombination and its importance on genomic integrity maintenance and cancer therapy. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1–13, 2019.
- PEPLING, M. E. Complex genomic rearrangement in CCS-LacZ transgenic mice. **Genesis**, v. 44, n. 2, p. 622–632, 2006.
- PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, 2001.
- RONCHI, J. A. et al. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 446–456, 2013.
- ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, 2012.
- SAATCIOGLU, H. D.; CUEVAS, I.; CASTRILLON, D. H. Control of Oocyte Reawakening by Kit. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 8, p. 1–20, 2016.
- SAGE, J. M. . K. L. K. Human Rad51 Promotes Mitochondrial DNA Synthesis Under Conditions of Increased Replication Stress. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 350–356, 2013.
- SAGE, J. M.; GILDEMEISTER, O. S.; KNIGHT, K. L. Discovery of a Novel Function for Human Rad51. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 18984–18990, 2010.
- SAGE, J. M.; KNIGHT, K. L. Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 350–356, 2013.
- SAINTIGNY, Y. et al. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. **EMBO Journal**, v. 20, n. 14, p. 3861–3870, 2001.
- SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 229–257, 2008.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896–1912, 2012.
- SCHON, E. A.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 12, p. 878–890, 2012.
- SCULLY, R. et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 265–275, 1997.
- SELESNIEMI, K. et al. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12319–12324, 2011.
- SHINOHARA, M. et al. Tid1/Rdh54 promotes colocalization of Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. **Pnas**, v. 97, n. 20, p. 10814–10819, 2000.
- SMITZ JE, C. R. The earliest stage of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 185–200, 2002.
- STEWART, J. B.; CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 9, p. 530–542, 2015.
- TAKATA, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. **EMBO Journal**, v. 17, n. 18, p. 5497–5508, 1998a.
- TAKATA, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. **EMBO Journal**, v. 17, n. 18, p. 5497–5508, 1998b.

- TAYLOR, M. R. G. et al. Rad51 Paralogs Remodel Pre-synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 271–286, 2015.
- THOMPSON, L. H.; SCHILD, D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 477, n. 1–2, p. 131–153, 2001.
- TILIA, L. et al. Oocyte meiotic spindle morphology is a predictive marker of blastocyst ploidy—a prospective cohort study. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 1, p. 105–113.e1, 2020.
- TITUS, S. et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 172, 2013.
- TITUS, S.; STOBEZKI, R.; OKTAY, K. Impaired DNA Repair as a Mechanism for Oocyte Aging: Is It Epigenetically Determined? **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 33, n. 6, p. 384–388, 2015.
- TSUZUKI, T. et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6236–6240, 1996.
- VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 3, p. 196–206, 2001.
- WAI, T. et al. The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility1. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 52–62, 2010.
- WALLACE, D. Mitochondrial Disease in Man and Mouse. **Science**, v. 283, n. March, p. 1482–1488, 1999.
- WALLACE, D. C.; CHALKIA, D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 10, p. 1–47, 2013.
- WANG, Q. et al. Evaluation of mitochondria in oocytes following γ -irradiation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. **Journal of Morphology**, v. 156, n. 2, p. 209–235, 1978.
- WIGGLESWORTH, K. et al. Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles1. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, p. 1–14, 2015.
- YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 2, p. 514–519, 1997.
- YAMADA, N. A. et al. XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23250–23254, 2004.
- YOON, S. W. et al. Rad51 regulates cell cycle progression by preserving G2/M transition in mouse embryonic stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 22, p. 2700–2711, 2014.
- YU, Y. et al. 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.
- ZHANG, T. et al. Effects of DNA damage and short-term spindle disruption on oocyte meiotic maturation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, n. 2, p. 185–194, 2014.
- ZHOU, B. S.; ELLEDGE, S. J. Checkpoints in Perspective. **Nature**, v. 408, n. November, p. 433–439, 2000.