

CAROLINA HABERMANN MACABELLI

**Derivação de células tronco pluripotentes induzidas a partir de pacientes
com doenças mitocondriais como modelo de estudo da herança
mitocondrial**

São Carlos

2015

CAROLINA HABERMANN MACABELLI

Derivação de células tronco pluripotentes induzidas a partir de pacientes com doenças mitocondriais como modelo de estudo da herança mitocondrial

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:

Departamento de Genética e Evolução

Área de concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M113d Macabelli, Carolina Habermann
Derivação de células tronco pluripotentes induzidas a partir de pacientes com doenças mitocondriais como modelo de estudo da herança mitocondrial / Carolina Habermann Macabelli. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
84 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. iPSCs. 2. Doenças mitocondriais. 3. Herança mitocondrial. 4. Mitofagia. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Carolina Habermann Macabelli, realizada em 30/11/2015.

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
UFSCar

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles
USP



São Paulo, 06 de Outubro de 2015.

DECLARAÇÃO

O projeto de Pesquisa abordando os aspectos moleculares e celulares das Doenças Mitocondriais está vigente desde 1993, com acompanhamento clínico sistemático dos pacientes e coleta de materiais biológicos para o estabelecimento dos diagnósticos laboratorial, histopatológico e molecular. Estes materiais biológicos foram coletados com o devido consentimento informado dos pacientes por ocasião do desenvolvimento da tese de doutorado e de livre docência de Suely Kazue Nagahashi Marie e atualmente constituem o biorepositório sob a sua guarda. Encontra-se em andamento o estudo colaborativo sobre as mitocondriopatias causadas por alteração do genoma mitocondrial, com Prof. Dr. Marcos R. Chiaratti, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, com uso compartilhado de amostras biológicas com mutação de ponto do DNA mitocondrial.


Ricardo Nitri
Chefe de Departamento de Neurologia
Professor Titular da Divisão de Neurologia Clínica
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo


Suely Kazue Nagahashi Marie
Professora Associada
Departamento de Neurologia
Coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular e Celular – LIM15
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo
e-mail: sknmarie@usp.br
tel 11-3061-7458

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por serem meus melhores amigos, as pessoas que eu mais admiro e a minha estrutura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo bem mais precioso que tenho, minha saúde.

Agradeço aos meus pais, Jucélio e Paula, por tudo que fazem por mim, pelo carinho e apoio incondicional durante minha vida toda. Agradeço pela dedicação, preocupação e por todo o incentivo com os estudos. Vocês sempre serão meu exemplo e inspiração pra tudo que faço na vida. Amo vocês.

Agradeço ao meu amor, Rafa, por estar comigo em todos os momentos, por todo o carinho e cuidado comigo. Por sempre fazer tudo o que pode pra me ver feliz, por ser meu amigo, minha paz e minha alegria. Agradeço também por poder ter sua companhia no laboratório, você sempre me incentivou e me ensinou muito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, pela enorme dedicação a esse projeto, por ser um orientador presente e pela oportunidade. Agradeço também por ser meu amigo (Marquinhos), por ter me ensinado tanto e compartilhado os seus princípios. É gratificante trabalhar com quem a gente admira. Agradeço também a sua esposa e minha querida amiga, Fernanda Altieri Ferreira (Fer) por todo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles, pela oportunidade que me ofereceu durante a graduação, por toda ajuda e pelo apoio enquanto trabalhei no LMMD durante parte do Mestrado. Estendo meus agradecimentos a todos os professores, alunos de pós graduação, e companheiros de trabalho durante esse período. Agradeço especialmente meus amigos Juliano Sangalli e Rodrigo Barreto por toda a ajuda, paciência, e pela companhia.

Aos meus amigos e companheiros de equipe de trabalho do LAGENBIO, Thiago Simoes Machado (Mr President), Thiago Bittencourt Rodrigues (Pardal), Mariana Trevisan (Mari), Fernanda Ribeiro (Fer), Karen Freire Carvalho (Ká) e Bruna Martins Garcia (Bru). Por serem as melhores companhias que eu poderia ter no laboratório. Por fazerem do meu dia a dia mais divertido e por estarem junto comigo nos momentos difíceis.

Aos meus inúmeros e queridos amigos e familiares que me apoiaram direta ou indiretamente durante todo este período.

Agradecimentos especiais aos colaboradores desse projeto, que acreditaram e ajudaram muito na realização dos experimentos, Dra. Fabiana Bressan, Profa. Dra. Suely K. N Marie, Prof. Dr. Francisco Guimarães e Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira.

Agradeço a FAPESP (2013/13869-5) por todo o suporte para a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Genética e Evolução e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

“We can't solve problems by using the same kind of thinking we used when we created them.”

Albert Einstein

RESUMO

MACABELLI, C. H. **Derivação de células tronco pluripotentes induzidas a partir de pacientes com doenças mitocondriais como modelo de estudo da herança mitocondrial.**

[Induced pluripotent stem cells derived from patients with mitochondrial diseases as a model for studying mitochondrial inheritance]. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

Disfunções mitocondriais causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) representam um importante grupo de patologias humanas. No entanto, não é possível prever com acurácia o risco de uma mulher acometida por uma mutação no mtDNA transmitir a patologia para seus descendentes. Isso se deve, em parte, ao desconhecimento dos mecanismos moleculares que controlam a herança mitocondrial. Com o desenvolvimento de metodologias que possibilitam a derivação de células pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células somáticas cultivadas in vitro, as iPSCs se tornaram um interessante modelo para o estudo da herança mitocondrial. A derivação de iPSCs de pacientes com mutações patogênicas no mtDNA tem revelado que a porcentagem de moléculas mutantes diminui ao longo do cultivo, sugerindo a existência na linhagem germinativa de mecanismos específicos para eliminação de mtDNAs mutantes. Portanto, o presente trabalho investigou em iPSCs derivadas de pacientes com desordens mitocondriais a existência de um mecanismo celular que elimina as moléculas de mtDNA com mutações patogênicas. Para tanto, foram utilizados fibroblastos heteroplásmicos portadores da mutação pontual A3243G no mtDNA causadora de encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo acidente vascular cerebral (MELAS); fibroblastos heteroplásmicos portadores de uma deleção de 4,9 kb no mtDNA causadora da Síndrome de Kearns-Sayre (KSS) e fibroblastos Controle, contendo apenas mtDNA selvagem. A derivação de linhagens portadoras de KSS resultou em iPSCs com baixos níveis de mtDNA mutante ($< 0,1\%$), e na eliminação de moléculas mutantes ao longo do cultivo. A derivação de linhagens portadoras de MELAS resultou em iPSCs com alta taxa de mutação ($> 98\%$), também com indícios de diminuição da quantidade de moléculas mutantes ao longo do cultivo. No entanto, ao contrário do esperado, não houve diminuição da quantidade de cópias de mtDNA nas iPSCs em relação aos fibroblastos em todas as linhagens (Controle, KSS e MELAS), sendo que as iPSCs de MELAS e KSS apresentaram um aumento significativo na quantidade de cópias de mtDNA, provavelmente devido a efeitos causados pela mutação no mtDNA. Ao analisar o efeito do tratamento com Rapamicina (indutor de mitofagia) durante a derivação de MELAS não observamos aumento na eficiência de

formação de colônias, além de o tratamento não afetar a quantidade de mtDNA mutante, resultando em iPSCs com níveis de mutação similares aos encontrados nas iPSC MELAS não tratadas com o rapamicina. Por fim, resultados de expressão gênica das iPSCs do grupo MELAS revelaram indícios de mecanismos autofágicos direcionados a mitocôndria provavelmente devido ao efeitos causados pela a alta taxa da mutação.

Palavras chave: iPSCs, doenças mitocondriais, herança mitocondrial, mitofagia.

ABSTRACT

MACABELLI, C. H. **Induced pluripotent stem cells derived from patients with mitochondrial diseases as a model for studying mitochondrial inheritance** [Derivação de células tronco pluripotentes induzidas a partir de pacientes com doenças mitocondriais como modelo de estudo da herança mitocondrial]. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

Mitochondrial dysfunctions caused by mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) represent an important group of human pathologies. However, it is not possible to predict with accuracy the risk of a woman with mutant mtDNA to transmit her pathology to her descendants. This is mainly due to our limited understanding of the molecular basis of mitochondrial inheritance. Since development of a technology that enabled derivation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from in vitro culture of somatic cells, iPSCs have become an interesting model to study mitochondrial inheritance. Derivation of iPSCs from patients with pathogenic mtDNA mutations has revealed that the mutant load decreases through in vitro culture of iPSCs, suggesting the existence of a specific mechanism that eliminates mutant mtDNA in the germ line. Thus, the aim of this work was to use iPSCs derived from patients with mitochondrial disorders to investigate the existence of a mechanism that eliminates mtDNA molecules with pathogenic mutations. In this way, we used heteroplasmic fibroblasts harboring a point mutation A3243G in mtDNA causing mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS); heteroplasmic fibroblasts harboring a deletion in mtDNA causing Kearns-Sayre Syndrome (KSS) and homoplasmic fibroblasts containing only wild-type mtDNA (Control). The KSS lineage derivation resulted in iPSCs with low levels of mutant mtDNA (<0,1%), and the elimination of mutant molecules during the culture. The MELAS derivation resulted in iPSCs with high levels of mutant mtDNA (> 98%), and indication of mutant molecules elimination as well. However, unexpectedly, there was no reduction of mtDNA content in iPSCs compared to fibroblasts in all lineages. On contrary, mtDNA copy number increased in MELAS and KSS iPSCs, perhaps due to the high levels of mutations in the cells. No effect of Rapamycin (mitophagy inductor) treatment was detected on the yield of colony formation in MELAS iPSCs. Additionally, Rapamycin did not affect the mutation levels in MELAS iPSCs compared to untreated iPSCs. Finally, gene expression analysis of MELAS iPSCs provided evidences of an autophagic mechanism directed towards the mitochondrion.

Keywords: iPSCs, mitochondrial disease, mitochondrial inheritance, mitophagy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A mitocôndria.....	20
2.2 Genoma mitocondrial	22
2.2 Doenças causadas por mutações no mtDNA	24
2.3 Herança de doenças mitocondriais.....	26
2.4 iPSCs como modelo de estudo da herança mitocondrial.....	30
3 HIPÓTESES	35
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Derivação e Cultivo de fibroblastos humanos.....	37
5.2 Derivação e cultivo de fibroblastos embrionários murinos para uso no cultivo de iPSCs	37
5.3 Produção de partículas lentivirais.....	38
5.4 Derivação, cultivo e caracterização de iPSCs	39
5.5 Quantificação do mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial	40
5.6 Análise das iPSCs por imunofluorescência quanto a presença de autofagossomos ...	42
5.7 Análise da expressão gênica em iPSCs	43
5.8 Análise dos dados.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Derivação de iPSCs de pacientes com KSS	48
6.1.1 Fosfatase Alcalina	49
6.1.2 Análise do número de cópias de mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial dos fibroblastos e das colônias iPSCs.....	50
6.2 Derivação de iPSCs de pacientes com MELAS	54
6.2.1 Tratamento com Rapamicina durante a Derivação de iPSCs de Pacientes com MELAS	55
6.2.2 Caracterização das linhagens de iPSCs	56
6.2.3 Análise do número de cópias de mtDNA	61
6.2.4 Análise de heteroplasmia.....	64
6.2.5 Resultados de Imunofluorescência	66
6.2.6 Expressão Gênica de iPSCs MELAS tratadas com Rapamicina e mdivi-1.....	67
7 CONCLUSÕES	77

REFERÊNCIAS	79
--------------------------	-----------

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde quando foram descobertas, há aproximadamente 25 anos, mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido apontadas como uma das principais causas de doença humana (STEWART; CHINNERY, 2015). Estudos epidemiológicos recentes têm mostrado a prevalência de aproximadamente 1 para 4300 na população (GORMAN et al., 2015), o que coloca as doenças mitocondriais entre as doenças genéticas mais comuns e evidenciam um grande problema de saúde para a sociedade.

Centenas de diferentes mutações pontuais e deleções de mtDNA tem sido associadas a uma vasta gama de sobreposição de fenótipos clínicos. Esses distúrbios podem se manifestar desde o nascimento até a idade adulta, são de natureza progressiva e com efeitos devastantes (STEWART; CHINNERY, 2015; SHON et al. 2012). Entre as mutações pontuais a mais comum é uma transição de A para G na posição 3243 no mtDNA que codifica o tRNA^{Leu} (UUR), o que provoca a encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios de tipo AVC (MELAS).

O tratamento para doenças mitocondriais continua sendo um grande desafio. Para a grande maioria dos pacientes a terapia é limitada a prevenir ou tratar as complicações das doenças, tais como a diabetes, problemas cardíacos, e epilepsia. Devido a estas limitações, muitos grupos de pesquisa têm se esforçado principalmente em evitar a transmissão da doença mitocondrial (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na herança mitocondrial ainda são desconhecidos. No geral os progressos nessa área são lentos, uma vez que há grande dificuldade em encontrar modelos animais para doenças mitocondriais e o uso de oócitos e embriões humanos na pesquisa envolve várias questões éticas.

A geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células somáticas adultas, realizada pela primeira vez em 2006 por Yamanaka (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006a) e colaboradores, abriu um campo promissor e vem sendo cada vez mais utilizada para elucidar os mecanismos envolvidos na herança de doenças mitocondriais (BUKOWIECKI; ADJAYE; PRIGIONE, 2014). A tecnologia de iPSCs utilizando células de pacientes portadores de doenças mitocondriais representa um interessante modelo para o estudo de mutações no mtDNA, uma vez que as modificações mitocondriais induzidas

durante a geração de iPSCs assemelham-se bastante ao que acontece naturalmente em células-tronco embrionárias (ESCs) (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012; PRIGIONE et al., 2010; SUHR et al., 2010). Nesse contexto, estudos recentes têm relatado a ocorrência de segregação mitocondrial resultando na produção de iPSCs com diferentes níveis de mtDNA mutante e inclusive colônias onde a mutação não estava mais presente (FOLMES et al., 2013; HÄMÄLÄINEN et al., 2013). Além disso, o cultivo prolongado em iPSCs tem indicado que o mtDNA é seletivamente eliminado em casos em que a mutação causa um grave efeito sobre a função da organela (CHERRY et al., 2013a; FUJIKURA et al., 2012a). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são conhecidos, mas há várias evidências de que a reprogramação pela qual as mitocôndrias passam durante a geração de iPSCs está intimamente associada a eliminação de mitocôndrias por autofagia (mitofagia) (DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012; MENENDEZ et al., 2011). Neste sentido, a ocorrência de mitofagia em iPSCs derivadas de pacientes com mutações patogênicas poderia estar envolvida na eliminação seletiva de mitocôndrias com mtDNAs mutantes.

Portanto, neste trabalho, utilizamos iPSCs derivadas de pacientes com desordens mitocondriais como modelo de estudo para investigar a eliminação de moléculas de mtDNA com mutações patogênicas. Para tanto, foram utilizados na derivação de iPSCs, fibroblastos portadores da mutação pontual A3243G no mtDNA causadora de MELAS e fibroblastos portadores de uma deleção de 4,9 kb no mtDNA causadora da Síndrome de Kearns-Sayre (KSS). Este trabalho deve contribuir com o conhecimento dos mecanismos responsáveis pela diminuição de mtDNAs mutantes em iPSCs derivadas de pacientes portadores de desordens mitocondriais, bem como contribuir para o entendimento da herança mitocondrial.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A mitocôndria

As mitocôndrias são organelas encontradas no citoplasma de todas as células nucleadas e possuem seu próprio DNA (mtDNA). Elas desempenham uma infinidade de funções em diversos eventos celulares como apoptose, homeostase de cálcio e degradação de ácidos graxos, mas a sua principal atividade é a produção de energia (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). As mitocôndrias possuem membrana dupla, compostas por uma membrana externa e outra interna, e o espaço entre elas é denominado de espaço inter-membranas. A membrana interna normalmente é mais extensa que a externa pois se dobra sobre si própria, criando compartimentos denominado cristas (MISHRA; CHAN, 2014).

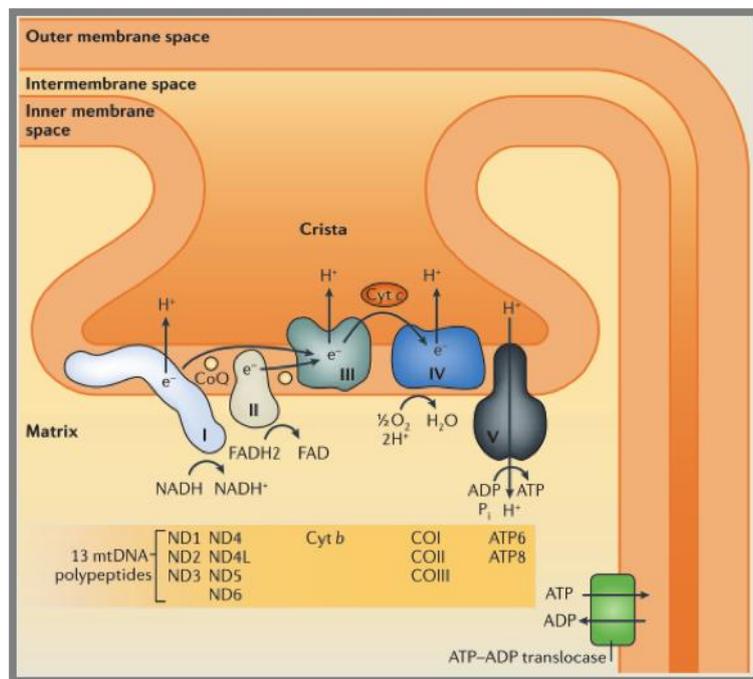
De acordo com a teoria endossimbiótica, a mitocôndria surgiu há aproximadamente dois bilhões de anos, quando uma bactéria primitiva (α proteobacterium) se associou com outra célula, resultando em uma das relações simbióticas mais duradouras da biologia (MERESCHKOWSKY, K. 1910 citado por STEWART; CHINNERY, 2015). Após a ocorrência da simbiose, a α proteobacterium tornou-se uma organela citoplasmática e gradualmente transferiu seu material genético para o núcleo da célula hospedeira. Durante milhões de anos, esse processo reduziu o tamanho do genoma da organela e consolidou a relação simbiótica, resultando na formação das mitocôndrias como são conhecidas na atualidade (STEWART; CHINNERY, 2015).

A mitocôndria é composta por cerca de 1.500 polipeptídios, sendo a maioria codificada pelo DNA nuclear (nDNA). No entanto, dos cerca de 80 polipeptídios envolvidos na cadeia transportadora de elétrons, 13 são codificados na própria mitocôndria pelo mtDNA (CHIARATTI et al., 2011). A produção de energia pela mitocôndria na forma de adenosina trifosfato (ATP) é realizada através de um processo conhecido como fosforilação oxidativa (OXPHOS) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Elétrons resultantes da oxidação de substratos energéticos, tais como carboidratos, lipídios e aminoácidos são carreados por quatro complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV), os quais compõem a cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana mitocondrial interna (Figura 1). A energia gerada durante o fluxo de elétrons por estes complexos é utilizada para armazenar prótons (H^+) provenientes da matriz mitocondrial no espaço inter-membranas. O gradiente de H^+ na mitocôndria gera um potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), o qual pode ser

convertido em ATP pelo retorno regulado dos H^+ para a matriz mitocondrial através de um quinto complexo, denominado complexo V ou ATP sintase (ALBERTS et al., 2010; MACHADO, 2014).

As mitocôndrias estão constantemente realizando fusão (junção de duas mitocôndrias) e fissão (separação de uma mitocôndria em duas organelas). Tais ciclos de fusão e fissão promovem a mistura de conteúdo de proteínas e mtDNA da célula e servem como um mecanismo de controle de qualidade mitocondrial (CHEN; CHOMYN; CHAN, 2005). A fusão depende primeiramente da fusão da membrana externa, mediada pelas mitofusinas 1 (MFN1) e MFN2, seguida da fusão da membrana interna, pela OPA1 (*dynamin-related protein optic atrophy 1*). O processo oposto, a fissão mitocondrial, requer o recrutamento da proteína DRP1 (*dynamin-related protein 1*) do citosol para a membrana externa mitocondrial, o que promove a constrição e divisão da organela em duas novas mitocôndrias (MISHRA; CHAN, 2014).

Figura 1: Complexos envolvidos na Fosforilação Oxidativa



Fonte: Adaptado de Mishra; Chan (2014)

Legenda: A figura exhibe os complexos: I (NADH-coenzima Q oxidoreductase), II (Succinato-Q oxidoreductase), III (Q-citocromo c oxidoreductase), IV (Citocromo c oxidase) e complexo V ou ATP sintase. As subunidades codificadas pelo mtDNA estão listadas em baixo de cada complexo da cadeia respiratória. Estes complexos também têm várias subunidades codificadas pelo genoma nuclear. O complexo II é codificado inteiramente pelo genoma nuclear. Os 2 rRNAs e 22 tRNA codificados pelo mtDNA são essenciais para a maquinaria de tradução mitocondrial que é usada para gerar os 13 polipeptídeos e, devido a isso, todos os 37

genes mitocondriais são críticos para OXPHOS. As proteínas restantes (> 1.000) da mitocôndria são codificadas pelo genoma nuclear, sintetizadas no citosol e importadas para as mitocôndrias. Complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana interna, que é usado para a produção de ATP pelo complexo V (ATP sintase). A ATP-ADP translocase exporta o ATP para o espaço intermembrana, onde se difunde livremente através da membrana externa para o citosol.

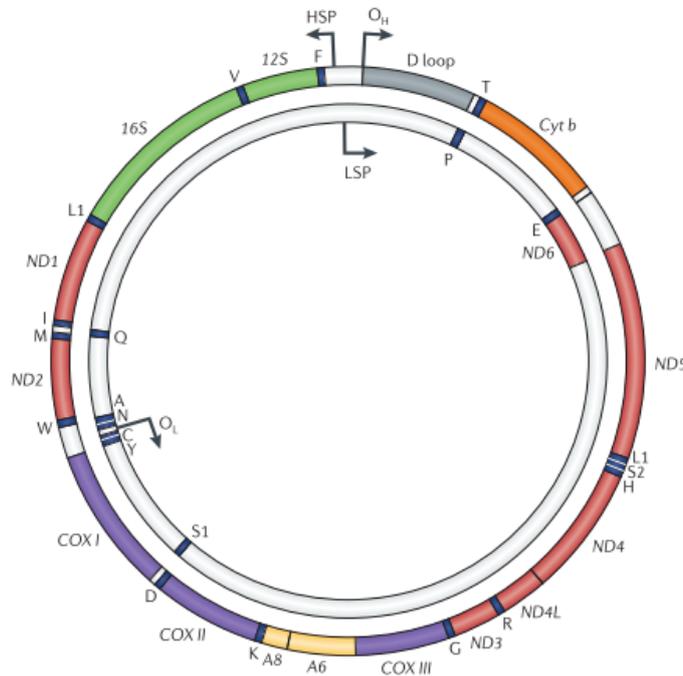
2.2 Genoma mitocondrial

O mtDNA humano contém 16.569 pares de bases, tem formato circular, não contém íntrons e está localizado na membrana interna da mitocôndria (ST. JOHN, 2014; CHIARATTI et al., 2011; STEWART; CHINNERY, 2015). Ele é responsável pela codificação de 13 RNAs mensageiros (mRNAs), que em seguida são traduzidos em polipeptídeos fundamentais para a OXPHOS. Também são codificados pelo mtDNA, 22 RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossômicos (rRNAs), os quais estão envolvidos na tradução dos mRNAs codificados pelo mtDNA (FREYER et al., 2012; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

O mtDNA é formado por duas fitas circulares de DNA (Figura 2). A fita interna é classificada como “leve” e a fita externa como “pesada” devido à maior quantidade de guanina, o que afeta seu peso molecular. A replicação das duas fitas é realizada por um complexo proteico contendo uma mtDNA-polimerase γ (Pol γ), uma helicase (TWINKLE, também conhecida como PEO1), uma topoisomerase I e proteínas que se ligam ao DNA de fita simples (ST. JOHN, 2014). A replicação depende também da interação do complexo proteico com a região não codificadora denominada D-loop, a qual é realizada através da interação com fatores de replicação e transcrição codificados pelo núcleo.

Segundo Stewart e Chinnery (2015), dois modelos de replicação do mtDNA tem sido propostos. Um modelo em que a replicação ocorre no sentido horário, iniciando na origem de replicação da fita pesada (O_H), estendendo-se até a origem de replicação da fita leve (O_L) (Figura 2). E um segundo modelo de replicação, que ocorre em algumas circunstâncias, em que a replicação é iniciada em diferentes pontos da região D-loop e prossegue em ambas as direções até a origem de replicação O_H , permitindo, a partir daí que o resto da molécula seja replicada em um única direção (Figura 2).

Figura 2: Genoma mitocondrial humano



Fonte: Adaptado de Schon; Dimauro; Hirano (2012).

Legenda: Genoma mitocondrial humano. Os 37 genes do DNA mitocondrial (mtDNA) o qual codifica 13 polipeptídeos divididos em sete subunidades: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, e ND6 - do Complexo I (NADH-Coenzima Q oxidoreductase); uma subunidade - citocromo b - do Complexo III (CoQ-citocromo c oxidoreductase), três subunidades - COX I, COX II, e COX III - do Complexo IV (citocromo c oxidase, ou COX), e duas subunidades - ATPase 6 e ATPase 8 - do Complexo V (ATP sintase). Também codifica dois rRNAs (em verde) e 22 tRNAs (em azul). A região de controle (D-loop) não é codificadora e contém os promotores da fita pesada e fita leve (HSP e LSP).

Diferente do DNA nuclear, existem centenas a milhares de cópias de mtDNA em cada célula e o número de cópias varia dependendo do metabolismo e do tipo celular (CHIARATTI et al., 2011). Células de tecidos com elevada exigência energética (e.g., células nervosas e musculares) contêm mais moléculas de mtDNA do que as de outros tecidos (e.g., leucócitos e monócitos) com menor necessidade energética (CHIARATTI et al., 2011). Uma vez que as mitocôndrias são o principal sítio de reações oxidativas dentro da célula, elas também são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROS). Devido à proximidade a estes sítios, a taxa de substituição de nucleotídeos no mtDNA é de cinco a dez vezes maior que no nDNA (CHIARATTI et al., 2011). Como resultado, o mtDNA é altamente polimórfico e moléculas mutantes e selvagens podem coexistir em uma mesma célula, tecido ou indivíduo, condição denominada heteroplasmia. No entanto, as sequências

codificantes do mtDNA foram extremamente preservadas durante a evolução, favorecendo a homoplasmia. Isto se deve à rápida segregação de mtDNAs polimórficos, o que é, em parte, explicado pela teoria do gargalo genético mitocondrial (vide abaixo) (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; KENNEDY et al., 2010).

2.2 Doenças causadas por mutações no mtDNA

Doenças mitocondriais causadas por mutações no mtDNA foram relatadas pela primeira vez em 1988 e, desde então, mais de 300 mutações patogênicas do mtDNA foram descritas (GRAVES; REEVE; TAYLOR, 2012). Essas doenças fazem parte de um grupo comum de desordens genéticas humanas e resultam de um defeito primário da OXPHOS, com consequente efeito sobre a produção de ATP (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015). As mutações no mtDNA podem ser pontuais, como nos casos de substituição de um único nucleotídeo, ou rearranjos de sequências, como deleções de até 10 kb (CHIARATTI et al., 2011).

Dentre as mutações pontuais, as mais comuns são: uma transição de A para G na posição 3.243 do mtDNA que codifica um tRNA^{Leu}(UUR), a qual causa MELAS; uma transição de A para G no nucleotídeo 8.344 do gene tRNA^{Lys}, a qual causa epilepsia mioclônica com fibras *Ragged-Red* (MERRF); e uma troca de T para G no nucleotídeo 8.993 do gene *ATP6*, a qual causa neuropatia periférica, ataxia, retinite pigmentosa, convulsões e demência (NARP) e Síndrome de Leigh herdada matematicamente (MILS) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; MACHADO, 2014).

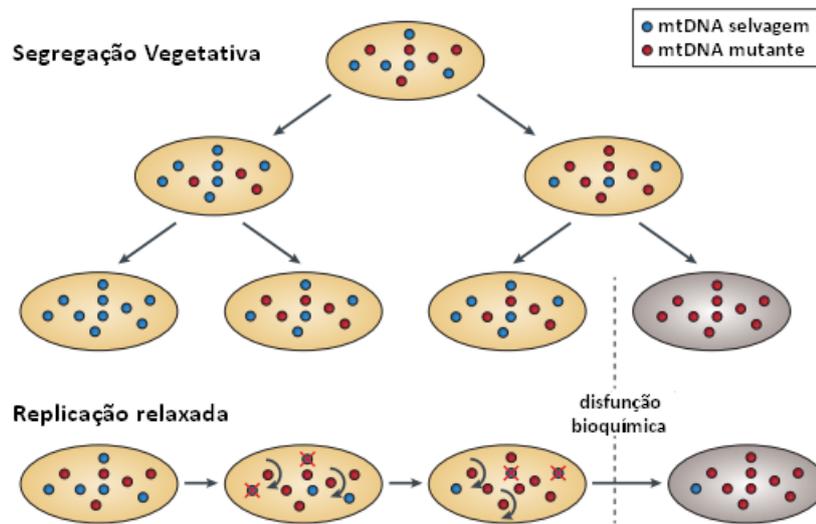
Com relação a rearranjos no mtDNA, os mais comuns são deleções parciais de grande escala que removem 2-10 kb de mtDNA e, provavelmente, ocorrem devido a presença de sequências curtas repetidas (5-13 pb) (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; MACHADO, 2014). As três desordens mais comuns causadas por esse tipo de mutação são: KSS; Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva (CPEO); ou Síndrome de Pearson (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012).

Como dito anteriormente, moléculas mutantes e selvagens podem coexistir em uma mesma célula, tecido ou indivíduo, condição denominada heteroplasmia. No entanto, uma quantidade relativamente alta da forma mutante é necessária para manifestação do fenótipo

clínico (STEWART et al., 2008c). Por motivos desconhecidos, esta quantidade varia entre tipos mutantes e costuma ser maior para mutações em genes codificadores de tRNAs (ao redor de 90%) do que em genes codificadores de polipeptídeos (ao redor de 70-80%) (STEWART et al., 2008a).

Pacientes com doenças mitocondriais podem apresentar níveis distintos da mutação em diferentes tecidos, principalmente devido ao fato de estar ocorrendo, ou não, divisão celular (tecidos mitóticos vs. tecidos não mitóticos). Quando uma célula se divide, as moléculas de mtDNA passam para as células filhas. Se houver a condição de heteroplasmia, então, por acaso, cada célula filha pode receber uma quantidade diferente das moléculas mutantes (Figura 3). Este processo é chamado de segregação vegetativa e fornece uma explicação para as alterações observadas na frequência da mutação em células em divisão (STEWART; CHINNERY, 2015).

Figura 3: Mudança de heteroplasmia ao longo da vida do indivíduo



Fonte: Adaptado de Stewart; Chinnery, (2015)

Legenda: mtDNA pode diferir nas células filhas, levando a uma mudança nos níveis de heteroplasmia (para cima ou para baixo) ao longo do tempo através da segregação vegetativa. Além disso, o mtDNA é continuamente renovado, mesmo em células que não se dividem (cruzes representam destruição, ao passo que as setas curvas representam a replicação). As moléculas são selecionadas para replicação ao acaso, de forma independente do ciclo celular, num processo conhecido como replicação relaxada. Se uma variante particular é copiada mais frequentemente do que a outra, as mudanças na proporção de moléculas do tipo selvagem e mutantes podem ocorrer ao longo do tempo, para cima ou para baixo.

No entanto, se uma mutação tem um efeito grave na função celular e, portanto, impede a replicação da célula, uma seleção contra a mutação irá ocorrer a nível celular. Esta seleção negativa é provavelmente a razão para que os níveis da mutação A3243G (MELAS) diminuam exponencialmente nas células brancas do sangue durante a vida (STEWART; CHINNERY, 2015).

Em células que não estão se dividindo, o mtDNA está continuamente sendo destruído e replicado, através de um processo conhecido como replicação relaxada (Figura 3). Este processo aleatório poderia explicar como uma mutação ocorrida no início da vida ou adquirida a partir do oócito leva a um defeito bioquímico em um indivíduo mais velho. No entanto, se houver uma tendência a favor ou contra uma molécula variante particular, esta irá influenciar a direção da replicação relaxada e acelerar a acumulação de uma das variantes moleculares. Por exemplo, as moléculas de mtDNA com uma deleção patogênica grande (até 10 kb) são bem menores que as moléculas do tipo selvagem e podem replicar mais rapidamente e, portanto, ficam disponíveis para a replicação com mais frequência. Isto pode levar a uma vantagem seletiva que favorece as moléculas menores, explicando por que deleções se acumulam ao longo do tempo (STEWART; CHINNERY, 2015).

Um dos grandes desafios das doenças mitocondriais continua sendo a variação acentuada em características clínicas dos pacientes, envolvendo vários órgãos diferentes e levando a doenças multissistêmicas. Para a grande maioria dos pacientes a terapia é limitada a prevenir ou tratar as complicações das doenças, tais como a diabetes, problemas cardíacos, e epilepsia. Devido a estas limitações, muitos grupos de pesquisa tem se esforçado principalmente em evitar a transmissão da doença mitocondrial (LIGHTOWLERS; TAYLOR; TURNBULL, 2015).

2.3 Herança de doenças mitocondriais

As patologias causadas por mutações no mtDNA são herdadas exclusivamente da mãe uma vez as mitocôndrias paternas são marcadas com ubiquitina e destruídas poucas horas após a fecundação (AL RAWI et al., 2011; MACHADO, 2014; SUTOVSKY et al., 1999). Análises da transmissão do mtDNA em animais tem revelado que genótipos heteroplásmicos segregam rapidamente dentro de poucas gerações (CREE; SAMUELS;

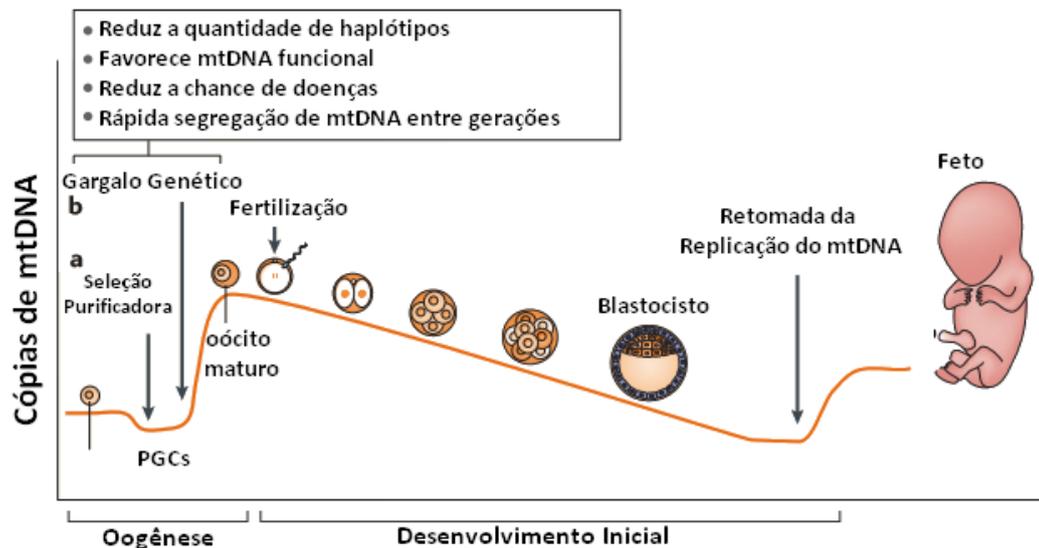
CHINNERY, 2009; HAUSWIRTH; LAIPIS, 1982; JENUTH et al., 1996; MEIRELLES; SMITH, 1997). Tais mecanismos foram relatados primeiramente em bovinos (KOEHLER et al., 1991) e mostraram que descendentes de uma mãe heteroplásmica podem ter níveis variados da mutação entre si e também em relação a mãe. Em casos extremos uma mãe com baixo mtDNA mutado pode gerar um filho praticamente homoplásmico para a mutação (MISHRA; CHAN, 2014). Estas observações suportam a hipótese de que há um efeito conhecido como gargalo genético mitocondrial durante a oogênese, de tal modo que apenas uma pequena fração de moléculas de mtDNA estão presentes no oócito maturo, como representado na Figura 4.

Embora a ocorrência de um gargalo genético de mtDNA durante oogênese seja amplamente aceito, o seu mecanismo molecular ainda não foi esclarecido. Durante a maturação do oócito, há um aumento drástico no conteúdo mitocondrial e no número de cópias de mtDNA, culminando em oócitos maduros (metáfase II) contendo mais de 100.000 cópias de mtDNA, provavelmente como forma de preparação para as demandas metabólicas da fertilização e do desenvolvimento inicial (MISHRA; CHAN, 2014). O gargalo genético possivelmente ocorre antes desse período de acumulação de mtDNA e sugere que a proliferação clonal de um pequeno grupo de moléculas de mtDNA durante o crescimento do oócito (WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008) e a subsequente redução do número de moléculas por célula conforme vão ocorrendo as clivagens durante o início do desenvolvimento embrionário (CREE et al., 2008; JENUTH et al., 1996; WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008) poderiam explicar as rápidas mudanças na frequência genotípica mitocondrial entre gerações (Figura 4).

No entanto, estudos recentes realizados com camundongos sugerem que outros mecanismos estão envolvidos na eliminação especificamente de mtDNAs mutantes (FAN et al., 2008; SATO et al., 2007; STEWART et al., 2008b). Sato et al. (2007) e Fan et al. (2008) mostraram uma redução seletiva de mtDNA patogênico durante a oogênese em camundongas heteroplásmicas. A prole dessas fêmeas tiveram menor quantidade da mutação conforme a idade materna aumentava. Em contrapartida, filhotes nascidos de camundongas portadoras de mutações não patogênicas apresentaram quantidade de mutações semelhantes à materna. Isto sugere que os oócitos contendo mutações de graves no mtDNA são seletivamente eliminados na linhagem germinativa de um modo dependente da idade (MISHRA; CHAN, 2014).

Outras evidências da existência de um mecanismo de controle de qualidade foram apresentadas por Stewart et al. (2008) ao investigaram a transmissão de altos níveis de mutações geradas a partir de uma linhagem de camundongos mutante em um dos domínios da mtDNA polimerase. As fêmeas que continham altos níveis de mutações do mtDNA foram acasaladas com machos com mtDNA selvagem, e a quantidade de mutações do mtDNA na prole foi comparada com a da mãe. Os resultados revelaram uma forte supressão de mutações que alteram a sequência de codificação de proteínas, o que é uma evidência clara de seleção genética. Em conjunto, estes resultados são consistentes com outros estudos em humanos e camundongos (FREYER et al., 2012; RAHMAN et al., 2001; RAJASIMHA; CHINNERY; SAMUELS, 2008), e sugerem que a seleção depende da função mitocondrial.

Figura 4: Segregação do mtDNA durante a transmissão materna



Fonte: Adaptado de Mishra; Chan (2014).

Legenda: Dois mecanismos principais afetam os genótipos mitocondriais durante o desenvolvimento do oócito: a seleção purificadora (parte a) e o gargalo genético mitocondrial (parte b). A seleção purificadora reduz a possibilidade de doenças graves no mtDNA e favorece a preservação de moléculas de mtDNA funcionais através da eliminação de oócitos contendo mutações deletérias. O gargalo genético mitocondrial pode ocorrer como um resultado da redução do número de cópias do DNA mitocondrial por célula ou amplificação de um subconjunto de moléculas de mtDNA. Independentemente do mecanismo, o resultado do gargalo é a diminuição do número de haplótipos dentro de um oócito. Este fenômeno também aumenta a variância genotípica entre oócitos maduros, um recurso que facilita a rápida segregação de variantes de mtDNA entre as gerações (MISHRA; CHAN, 2014).

Os principais mecanismos que estariam envolvidos nesta seleção de mtDNA se baseia em duas hipóteses principais, primeiro que a seleção estaria acontecendo a nível

celular, e uma segunda hipótese baseada na seleção a nível de organela. A hipótese a nível celular se baseia no fato de que a redução do número de cópias de mtDNA por célula durante o início do desenvolvimento embrionário, quando o mtDNA não é replicado, poderia maximizar o efeito de mtDNAs mutantes, tornando possível a seleção em nível celular (KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). Como por exemplo, durante o período em que as PGCs migram para as gônadas e se diferenciam em oogônias, as células com altos níveis de mutações poderiam migrar e dividir-se mais lentamente (FAN et al., 2008; KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). Por outro lado, somente cerca de 30% das oogônias estabelecidas durante a vida fetal atingem o estágio de oócito maturo, as demais são eliminadas por apoptose. Uma vez que mitocôndrias disfuncionais devido a mutações no mtDNA gerariam elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), este poderia ser o sinal para seleção negativa por apoptose das oogônias e/ou oócitos com elevados níveis de mtDNA mutante (FAN et al., 2008; KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c).

Um segundo possível mecanismo seria a seleção em nível da organela (KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). O número de cópias de mtDNA é limitado a uma a duas moléculas por organela nas células germinais, contrastando com um número muito maior de até 10 moléculas presente em células somáticas (CAO et al., 2007; KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). Desta forma, mutações em algumas moléculas de mtDNA poderiam ser distinguidas de moléculas selvagens presentes na mesma célula pelo efeito da mutação no fenótipo mitocondrial (KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). Isto posto, mitocôndrias disfuncionais poderiam ser eliminadas por mecanismos intracelulares como autofagia (ELMORE et al., 2004). Evidências deste mecanismo foram apresentadas por Twig et al. (TWIG et al., 2008) ao mostrarem que mitocôndrias defeituosas possuem menor capacidade de fusão com as demais mitocôndrias da célula e acabam sendo autofagocitadas. Embora este evento tenha sido descrito em células somáticas, ele está também presente em células germinais (CHEN et al., 2011; TSUKAMOTO et al., 2008) e, portanto, poderia estar envolvido na remoção de mtDNAs mutantes (GILKERSON et al., 2012). Uma segunda hipótese para a seleção em nível da organela seria a competição entre mitocôndrias normais e mitocôndrias com disfuncionais (STEWART et al., 2008c). Neste caso, mitocôndrias disfuncionais seriam menos eficientes para a importação e função enzimática de proteínas codificadas pelo nDNA que são necessárias para a replicação do mtDNA. Isto poderia resultar em vantagem replicativa das moléculas selvagens sobre as

mutantes, consequentemente reduzindo a proporção de moléculas mutantes na linhagem germinativa e na próxima geração (KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c). Embora Wai et al.(WAI; TEOLI; SHOUBRIDGE, 2008) tenham reportado que uma sub-população de mtDNAs é preferencialmente replicada durante a foliculogênese para povoar o oócito, não existem indícios de como esta sub-população é selecionada. Caso tal mecanismo exista, este poderia compreender a seleção de moléculas selvagens, o que explicaria o padrão observado de seleção negativa de moléculas mutantes (KENNEDY et al., 2010; KHRAPKO, 2008).

2.4 iPSCs como modelo de estudo da herança mitocondrial

Células-tronco embrionárias (ESCs) são derivadas da massa celular interna de blastocistos e retêm a habilidade de propagarem-se indefinidamente e diferenciarem-se em todos os tecidos derivados dos três folhetos germinativos. Em 2006, células somáticas de camundongos foram pela primeira vez reprogramadas com sucesso a um estado semelhante a ESCs por expressão forçada e de forma ectópica de uma combinação de genes comumente presentes em ESCs (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b). As iPSCs são semelhantes as ESCs e partilham das mesmas características básicas de auto-renovação e pluripotência. Tais características, somado a natureza isogênica das iPSCs e aos métodos de derivação dessas células que não demandam o uso de embriões, têm assegurado um futuro promissor para as iPSCs como candidatas a terapia celular paciente-específico e modelo *in vitro* para estudo de doenças humanas (RODOLFA; EGGAN, 2006).

A reprogramação celular desencadeada durante a geração de uma iPSC envolve, entre outros eventos, modificações na mitocôndria que resultam em organelas imaturas semelhantes às encontradas em embriões ou em ESCs (PRIGIONE et al., 2010; SERIN et al., 2011; SUHR et al., 2010). Assim como acontece nos embriões, tais modificações parecem ter a finalidade de preservar as iPSCs dos efeitos nocivos da geração de EROS advinda da atividade mitocondrial. Como resultado, as mitocôndrias nas iPSCs caracterizam-se por apresentarem cristas subdesenvolvidas, indicativo da inatividade mitocondrial (PRIGIONE et al., 2010; SUHR et al., 2010). Consequentemente, as iPSCs exibem uma baixa reserva de ATP e um aumento da taxa de produção de lactato (PRIGIONE et al., 2010). Resultados similares foram descritos para ESCs, sugerindo que

ambos os tipos celulares pluripotentes dependem da via anaeróbica glicolítica para geração de energia (PRIGIONE et al., 2010; SERIN et al., 2011; SUHR et al., 2010). Além disso, têm se mostrado que a quantidade de mitocôndrias e de mtDNAs nas iPSCs é menor se comparado as células somáticas utilizadas na derivação das iPSCs (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; PRIGIONE et al., 2010; SUHR et al., 2010). Similarmente, os fatores nucleares envolvidos na biogênese mitocondrial têm expressão semelhante ao padrão descrito para ESCs (PRIGIONE et al., 2010). Uma vez que a função mitocondrial é controlada pelo núcleo, têm se proposto que a reprogramação genética induzida na produção de iPSCs poderia também transmitir informações para a mitocôndria revertendo-a a um estado imaturo análogo (PRIGIONE et al., 2010).

Considerando que as modificações mitocondriais induzidas durante a geração de iPSCs assemelham-se bastante ao gargalo genético mitocondrial (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; PRIGIONE et al., 2010; SUHR et al., 2010), a produção de iPSCs utilizando células de pacientes portadores de doenças mitocondriais representa um interessante modelo para o estudo de mutações no mtDNA (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; PRIGIONE et al., 2010; SUHR et al., 2010). Neste sentido, este modelo já vem sendo aplicado em trabalhos com iPSCs derivadas de pacientes portadores de doenças mitocondriais como MELAS (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012; HÄMÄLÄINEN et al., 2013) e Síndrome de Pearson (CHERRY et al., 2013b). Curiosamente, esses trabalhos relataram a ocorrência de segregação mitocondrial resultando na produção de iPSCs com diferentes níveis de heteroplasmia e inclusive colônias onde a mutação não estava mais presente.

Fujikura et al. (FUJIKURA et al., 2012b) relataram que cerca de 50% das colônias de iPSCs produzidas utilizando fibroblastos com aproximadamente 20% de mtDNA mutante para MELAS (A3243G) apresentavam níveis indetectáveis da mutação. Além disso, o cultivo prolongado de iPSCs derivadas de uma única colônia de iPSC com 50% de mtDNA portador da mutação G13513A, também relacionada a MELAS, evidenciou uma queda acentuada nos níveis de heteroplasmia, resultando depois de 40 passagens em células com somente 7% de mtDNA mutante (FOLMES et al., 2013). De modo similar, o cultivo de três colônias de iPSCs portadoras de 55-70% de Δ -mtDNA (deleção de 2,5 kb), relacionada com a Síndrome de Pearson, resultou na diminuição acentuada do nível de mtDNA mutante em duas colônias enquanto na terceira o nível se manteve estável e ao redor de 50% (CHERRY et al., 2013b). Juntos esses resultados revelam uma segregação das mutações mitocondriais

acentuada em iPSCs, que por sua vez tem possibilitado o isolamento iPSCs livres da mutação a partir de pacientes portadores de doenças mitocondriais.

As modificações pelas quais as mitocôndrias passam durante a reprogramação em iPSCs parecem ser dependentes da dinâmica mitocondrial (balanço entre fusão e fissão) (CHEN; CHAN, 2010; TWIG; SHIRIHAI, 2011) que segrega as mitocôndrias destinadas a destruição por autofagia (CHEN et al., 2011; ELMORE et al., 2004; MENENDEZ et al., 2011; TWIG et al., 2008; VAZQUEZ-MARTIN et al., 2012), resultando na eliminação de mitocôndrias disfuncionais e no desenvolvimento do metabolismo glicolítico (FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; PRIGIONE et al., 2010; SERIN et al., 2011; SUHR et al., 2010). Evidências desse papel benéfico da autofagia na reprogramação celular foram fornecidas por Chen et al. (CHEN et al., 2011) ao utilizarem indutores farmacológicos de autofagia na derivação de iPSCs. Esses autores observaram que a inibição da via do mTOR (mammalian target of rapamycin) por tratamento com rapamicina ou PP242 aumentou em cinco vezes a eficiência de reprogramação em iPSCs. Em acordo com esses resultados, Vazquez-Martin et al. (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2012) mostraram que o tratamento com mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor), uma molécula que inibe seletivamente a fissão mitocondrial e, conseqüentemente, a mitofagia, resultou em redução drástica da eficiência de produção de iPSCs. Portanto, esses achados fornecem evidências claras de que a reprogramação pela qual as mitocôndrias passam durante a geração de iPSCs está intimamente associada a ocorrência de mitofagia (MENENDEZ et al., 2011). Neste sentido, é interessante investigar se nos casos onde iPSCs são derivadas de células portadoras de mutações patogênicas no mtDNA, a ocorrência de mitofagia durante a reprogramação celular poderia resultar na eliminação seletiva de mitocôndrias com mtDNAs mutantes (ELMORE et al., 2004; GILKERSON et al., 2012; KENNEDY et al., 2010; STEWART et al., 2008c; TWIG; SHIRIHAI, 2011; TWIG et al., 2008). Como relatado em iPSCs (HÄMÄLÄINEN et al., 2013) e em células somáticas (FREYER et al., 2012; GILKERSON et al., 2012), mitocôndrias portadoras de moléculas mutantes poderiam ser seletivamente eliminadas por autofagia devido ao efeito da mutação sobre a função mitocondrial (ELMORE et al., 2004; TWIG; SHIRIHAI, 2011; TWIG et al., 2008).

Além disso, este mecanismo poderia estar envolvido na diminuição e, em alguns casos, eliminação, de mtDNAs mutantes em iPSCs derivadas de pacientes portadores de MELAS e Síndrome de Pearson (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b). Como discutido acima, parece haver um consenso a respeito da existência de

um mecanismo biológico na linhagem germinativa que está envolvido na destruição de mtDNAs portadores de mutações patogênicas (CREE; SAMUELS; CHINNERY, 2009; FREYER et al., 2012; KENNEDY et al., 2010; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012; STEWART et al., 2008c). Portanto, estudos que esclareçam os mecanismos responsáveis pela diminuição de mtDNAs mutantes em iPSCs derivadas de pacientes portadores de desordens mitocondriais são interessantes não somente por esclarecer os mecanismos subjacentes à geração de iPSCs mas também por contribuir para o entendimento da herança mitocondrial.

HIPÓTESES E OBJETIVOS

3 HIPÓTESES

A reprogramação celular que ocorre durante a geração de iPSCs resulta em alterações mitocondriais que levam a seleção negativa de moléculas de mtDNA com mutações patogênicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar em iPSCs derivadas de pacientes com desordens mitocondriais a existência de um mecanismo que elimina as moléculas de mtDNA com mutações patogênicas.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a eficiência de geração de iPSCs utilizando fibroblastos derivados de pacientes com MELAS, KSS, e indivíduos normais (Controle);
- 2) Avaliar o número de cópias de mtDNA e a heteroplasmia mitocondrial nas iPSCs em função do tempo de cultivo de iPSCs do grupo MELAS, KSS e Controle;
- 3) Se houver indícios da existência de um mecanismo de seleção negativa de mtDNAs mutantes, avaliar o número de cópias de mtDNA e a heteroplasmia mitocondrial na linhagem de iPSCs com tais indícios por tratamento com promotor (rapamicina) e/ou inibidor (mdivi-1) de autofagia;

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Derivação e Cultivo de fibroblastos humanos

Os cultivos de fibroblastos utilizados neste experimento foram cedidos pela Profa. Dra. Suely K. N. Marie da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). Conforme apresentado na declaração no início dessa dissertação, esses cultivos foram estabelecidos a partir de pacientes com quadro clínico compatível com a patologia de interesse como confirmado por análises histológicas, histoquímicas e moleculares. Especificamente, as análises moleculares foram empregadas pela Dr. Suely K. N. Marie para identificar as mutações no mtDNA características de MELAS (e.g., digestão de produto de PCR com enzima de restrição que distingue a troca de A para G no nucleotídeo 3.243) e KSS (e.g., sequenciamento do mtDNA entre os nucleotídeos 5.685 e 16.220). Tais análises confirmaram a existência em condição heteroplásmica tanto da mutação A3243G nos pacientes portadores de MELAS como da deleção de 4,9 kb nos pacientes portadores de KSS (MARIE, S. K. N., 2001).

As linhagens de fibroblastos utilizadas neste trabalho encontravam-se entre a primeira e terceira passagem. Estas linhagens foram expandidas em garrafas de cultivo de 75 cm² com meio IMDM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco). Os fibroblastos foram mantidos em incubadora a 37°C com máxima umidade e 5% de CO₂ (condição padrão da incubadora). Antes de atingirem 90% de confluência, os fibroblastos foram repicados por tratamento com Tryple Express (Invitrogen) por 5 min, centrifugados a 300 x g por 5 min e o precipitado de células replaqueado em novas garrafas contendo meio IMDM suplementado como descrito acima. Alternativamente, as células foram criopreservadas em meio IMDM contendo 20% de SFB, 10% de DMSO (Sigma), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

5.2 Derivação e cultivo de fibroblastos embrionários murinos para uso no cultivo de iPSCs

Fêmeas híbridas (C57BL/6 X CBA/J) foram acasaladas com machos da mesma linhagem e a cópula confirmada por observação da presença de tampão vaginal (plug). Após 13 dias da observação do plug vaginal as fêmeas prenhes foram sacrificadas para recolhimento dos úteros gravídicos os quais foram alocados em placas com solução salina fosfatada (PBS) suplementada com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 50 µg/ml de nistatina (Sigma) (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b). Após lavagem em PBS, os úteros foram dissecados e os fetos recuperados. A cabeça, os membros e os órgãos torácicos e abdominais foram removidos e o restante do embrião foi picotado e mantido em incubadora de cultivo por 3 h com 40 mg/ml de colagenase I (Sigma). Após digestão, as células foram cultivadas na proporção de uma garrafa de cultivo de 75 cm² para cada 3 embriões dissecados. Após 48 h, os cultivos foram criopreservados para posterior utilização (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b).

Para produção de monocamadas de fibroblastos murinos (MEFs) previamente inativadas mitoticamente, garrafas de cultivo de 75 cm² apresentando aproximadamente 80% de confluência foram tratadas com 10 mg/ml de mitomicina (Sigma) por 3 h em incubadora de cultivo. Após este período os cultivos foram tripisinizados e replaqueados em placas de cultivo na concentração de 1×10^5 células por placa de 35 mm (placa de 6 poços) (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b).

5.3 Produção de partículas lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas utilizando o kit STEMCCA Cre-Excisable Constitutive Polycistronic OKSM Lentivirus Reprograming (Merck Millipore) por lipofecção de células 293FT (Invitrogen) com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como descrito previamente (SOMMER et al., 2009, 2010). Para tal, 5×10^6 células 293FT foram plaqueadas no dia anterior em placas de Petri 100 mm de modo a apresentarem 90% de confluência no momento da transfecção. Foram utilizados 12 µg do vetor lentiviral policistrônico excisável STEMCCA e 2 µg de cada vetor auxiliar, com exceção do

plasmídeo VSVG do qual foram utilizados 2,4 µg. O vetor STEMCCA contém as sequências dos transcritos humanos OCT4, KLF4, SOX2 e c-MYC, enquanto os vetores auxiliares consistem de construções contendo as sequências TAT, REV, Hgpm2 e VSVG (SOMMER et al., 2009, 2010). A transfecção com lipofectamina foi realizada por um período de 12-16 h (overnight) quando o meio de cultivo foi descartado e substituído por meio novo. O meio de cultivo contendo as partículas virais foi recolhido após 24 e 48 h da transfecção, filtrado em filtro com membrana PES de 0,45 µm e utilizado imediatamente para transdução dos fibroblastos (vide abaixo).

5.4 Derivação, cultivo e caracterização de iPSCs

A transdução foi realizada utilizando fibroblastos plaqueados no dia anterior na quantidade de 10^5 células por placa de 6 poços, 1 ml do meio filtrado contendo lentivírus e 8 ηg/µl de polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma) (SOMMER et al., 2009, 2010). O meio de cultivo foi renovado após 12-16 h do início da incubação. Cerca de 6 dias após a transdução as células foram transferidas para MEFs por um mínimo de 14 dias. Durante este período as células foram cultivadas em DMEM/F12 Knockout (Invitrogen) suplementado com 20% de substituto de soro knockout (KSR, Invitrogen), 1% de glutamina (Invitrogen), 0,07 µl/ml de 1000X β-mercaptoetanol (Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 10 ng/ml bFGF (Peprotech), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 100µg/mL de piruvato (Sigma) e 50µg/mL de uridina (Sigma). Nos casos de tratamento com Rapamicina durante a derivação, esta foi utilizada na concentração de 0,3nM (CHEN et al., 2011). Após aproximadamente 20 dias da transdução as prováveis colônias de iPSCs foram selecionadas quanto a morfologia e repicadas manualmente. A partir deste momento, cada colônia foi cultivada individualmente para estabelecimento das linhagens de iPSCs. A partir do segundo repique as passagens celulares foram realizadas semanalmente. A caracterização das colônias foi feita com base na morfologia, expressão de fosfatase alcalina e imunofluorescência (TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 e SSEA4) (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; SOMMER et al., 2009, 2010; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b).

5.5 Quantificação do mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial

Para análise da quantidade de cópias de mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial foram utilizados pellets de células no caso de fibroblastos e parte de colônias coletadas manualmente no caso de iPSCs. No caso dos fibroblastos, estes foram tratados com Tryple Express por 5 min, centrifugados a 300 x g por 5 min e um precipitado de células contendo 3×10^4 células foi estocado a -80°C . As iPSCs foram coletadas manualmente utilizando um estereomicroscópio, lavadas em PBS e estocadas em 2 μl de PBS a -80°C . Parte da colônia de células foi antes transferida para uma nova placa contendo MEFs para continuar o cultivo da linhagem.

Para análise da quantidade de mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial as amostras de fibroblastos e iPSCs foram incubadas com 50 μl e 20 μl , respectivamente, em solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl_2 , 0,1 mg/ml gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K] por 3 h à 55°C (MACHADO et al., 2015; SHITARA et al., 2000). Ao final, as amostras foram incubadas por 10 min à 95°C para inativação da proteinase K, diluídas 1:5 em água ultrapura e usadas para análise da heteroplasmia e do número de cópias de mtDNA.

A quantidade de cópias de mtDNA foi mensurada por PCR quantitativo (qPCR) a partir de *primers* que amplificam uma sequência de 94 pb compreendida entre as posições 7.773 e 7.847 do mtDNA (*primers* Cópias, Tabela 1). Além disso, conforme proposto por Bai et al.(BAI; WONG, 2005), também foram utilizados *primers* que amplificam parte de um gene nuclear de cópia única (*B2M*) com o objetivo de corrigir o número de cópias de mtDNA para o número de células na amostra (*primer* B2M, Tabela 1).

A heteroplasmia mitocondrial também foi determinada por qPCR utilizando um ensaio que amplifica especificamente as moléculas de mtDNA mutantes ou selvagens.

No caso de células com MELAS a porcentagem de moléculas mutantes foi estimada pela metodologia de ARMS-PCR(NEWTON et al., 1989). Foram utilizados os *primers* descritos por Wang. et al.(BAI; WONG, 2004), (Tabela 1) onde a discriminação das sequências é feita por dois conjuntos de *primers* diferentes. Mais especificamente, a extremidade 3' dos *primers forward* desses conjuntos anelam exatamente sobre o nucleotídeo da mutação, na posição 3.243 do mtDNA, e cada *primer* possui nesta posição um

nucleotídeo complementar a uma das sequências alvo (mutante ou selvagem). Além disso, há a adição de um *mismatch* (nucleotídeo que não anela na sequência alvo) na posição que antecede a última base da extremidade 3' do *primer*, o que possibilita a mensuração da porcentagem de cópias mutantes com sensibilidade de 0,1%.

Com relação às células com KSS, os ensaios de qPCR foram desenhados a partir de resultados de sequenciamento das duas linhagens portadoras de KSS utilizadas nesse trabalho, que revelou que tanto uma linhagem quanto a outra apresentavam a deleção de 4.977 pb. (posição 8.469 até 13.447 pb do mtDNA). Consequentemente, a porcentagem de cópias mutantes foi determinada a partir de dois conjuntos de *primers*, um que amplifica o mtDNA selvagem e anela dentro da região deletada enquanto que um segundo conjunto amplifica o mtDNA mutante e anela na região que flanqueia a deleção (Tabela 1).

Todas as reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM SDS 7500fast HT Real-Time PCR System (Life Technologies). As condições de termociclagem foram otimizadas antes da realização dos experimentos. Todas as amostras foram analisadas em duplicata para KSS e em triplicata para MELAS e a heteroplasmia calculada seguindo-se o método da curva-padrão (FERREIRA et al., 2010; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em todas as reações de PCR foi utilizado um controle negativo e a especificidade das sequências amplificadas foi confirmada por análise dos produtos de PCR em gel de agarose.

Tabela 1: Primers utilizados para quantificação de cópias de mtDNA e heteroplasmia mitocondrial.

Nome Primer	Sequência amplificada	Sequência do primer (5' 3')	Tamanho do Produto (pb)
MELAS Selv F ^a	MELAS Selvagem	CAGGGTTTGTTAAGATGGCA _t A	97
MELAS Selv R ^a		TGGCCATGGGTATGTTGTTA	
MELAS Mut F ^b	MELAS Mutante	CAGGGTTTGTTAAGATGGCA _t G	97
MELAS Mut R ^b		TGGCCATGGGTATGTTGTTA	
KSS Selv F ^c	KSS Selvagem	TCGGTTTCATCCTCGCCTTAG	95
KSS Selv R ^c		GGTGAGGCTTGGATTAGCGTT	
KSS Mut F ^d	KSS Mutante	GTATGGCCCACCATAATTACCC	114
KSS Mut R ^d		CTAATGCTAGGCTGCCAATGGT	
KSS Seq F ^e	mtDNA	TCTACCCCTCTAGAGCCCA	298
KSS Seq R ^e		AGATAGGGCTCAGGCGTTTG	
Cópias F ^f	mtDNA	CCGTCTGAACTATCCTGCCC	94
Cópria R ^f		GAGGGATCGTTGACCTCGTC	
B2M F ^g	nDNA	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	86
B2M R ^g		TCTCTGTCCCCACCTCTAAGT	

^{a,b}Conjunto de *primers* utilizados para amplificação de mtDNA selvagem e mutante, respectivamente em células de pacientes com MELAS. ^{c,d}Conjunto de *primers* utilizados para amplificação de mtDNA selvagem e mutante respectivamente em células de pacientes com KSS. ^eConjunto de *primers* que flanqueiam a deleção KSS e cujo o produto foi utilizado no sequenciamento. ^fConjunto de primers utilizados para amplificação do número total de cópias de mtDNA, independente das mutações utilizadas no trabalho. ^gConjunto de primers que amplificam parte de um gene nuclear de cópia única, utilizado na correção de cópias de mtDNA para o número de células da amostra.

5.6 Análise das iPSCs por imunofluorescência quanto a presença de autofagossomos

Para a realização da técnica de imunofluorescência, as colônias de iPSCs foram previamente repicadas sobre lamínulas contendo MEFs tratadas com mitomicina. Após 5 dias de repique as colônias de iPSCs foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 min a temperatura ambiente e permeabilizados com 0,5% de triton X-100 por 15 min. A seguir as colônias foram incubados por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo policlonal anti-Map1Lc3b produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído 1:200 em PBS com 1% de BSA. Após lavagem em PBS, as colônias foram incubados por 1 h com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, EUA), o qual foi diluído 1:400 em PBS com 1% de BSA.

Finalmente, as colônias foram lavadas em PBS 1% de BSA e a montagem das lâminas foi realizada com auxílio de ProLong Gold. As iPSCs foram analisados em microscópio confocal invertido Zeiss LSM710, com o software ZEN v. 2008 (Oberkochen, Alemanha) e as imagens foram obtidas na objetiva de 63x com imersão em água e ajuste do plano focal na região central das colônias. Para visualização dos autofagossomos foi considerado excitação e emissão na faixa de 495 e 519 nm, respectivamente.

5.7 Análise da expressão gênica em iPSCs

As colônias de iPSCs foram previamente tratadas por 48h com 250nM de Rapamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) ou 3h com 50 μ M de mdivi-1(Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Como controle do tratamento, a mesma quantidade de DMSO usada na diluição das drogas foi adicionada aos dois grupos. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo recomendações do fabricante com pequenas modificações. Resumidamente, um *mix* contendo 300 μ l do reagente TRIzol e 15 μ g de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX, USA) foi adicionado a cada amostra de iPSCs. Logo após, houve a adição de 60 μ L de clorofórmio com a finalidade de separar a fase aquosa da orgânica, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos. Em seguida, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado por adição de 150 μ L de álcool isopropílico seguido de centrifugação a 12.000 x g durante 10 minutos. O pellet de RNA foi lavado com 300 μ L de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g durante 5 minutos. O etanol 75% foi então removido e o pellet eluído em 5 μ L de H₂O DEPC. O RNA extraído foi tratado com 5 μ l de solução de DNase I (Invitrogen) mais 1 unidade/ μ l de RNase OUT para a degradação de DNA contaminante conforme recomendações do fabricante. Imediatamente após o tratamento com DNase I, o RNA foi convertido em cDNA com o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenado a -20°C até o uso.

Com relação aos ensaios utilizados para análise da expressão gênica, os primers foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Os transcritos alvos considerados foram os seguintes: *MT-ND2*, *SDHA*, *MT-CYB*, *MT-CO1*, *DNM1L*, *FBXO7*, *PARK2* (PARKIN), *PARK6* (PINK), *OPA1*, *OMA1*, *LC3B*, *ACTB*, *GAPDH*, e *PPIA*. (Tabela 2). Sempre que possível, os *primers* foram desenhados sobre junções éxon-éxon para evitar a amplificação de possível DNA genômico contaminante.

A quantificação relativa dos transcritos foi realizada no equipamento ABI PRISM SDS 7500 HT Real-Time PCR System (Life Technologies) em reações de 15 µl contendo 0.2 µM de *primers* (descritos acima), 1x SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) e 2 µl de um cDNA. Foram realizadas curvas de diluição de cDNA com a finalidade de ajustar as condições dos experimentos. Com base nos resultados, os transcritos *MT-ND2*, *SDHA*, *MT-CYB*, *MT-CO1*, *ACTB*, *GAPDH*, e *PPIA* foram analisados utilizando o cDNA de todas as amostras 40 vezes diluído (1 µl de cDNA + 39 µl de H₂O). Já para os transcritos *DNM1L*, *FBXO7*, *PARK2* (PARKIN), *PARK6* (PINK), *OPA1* e *OMA1* as amostras de cDNA foram diluídas 9 vezes (1 µl de cDNA + 8 µl de H₂O). No entanto os primers desenhados para *LC3B* não puderam ser utilizados neste experimento, devido aos ensaios apresentarem a formação de dois produtos de PCR, indentificados por gel de agarose. Todas as amostras foram analisadas, para determinado transcrito, em duplicata na mesma placa de PCR. As seguintes condições de ciclagem foram utilizadas para amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela análise da curva de *melting* e gel de agarose.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (q-PCR)

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto de PCR (pb)
<i>MT-ND2</i>	Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2	F: AGCACCACGACCCTACTACT	122
		R: CATTGGGGCAAAAAGCCGGT	
<i>SDHA</i>	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	F: TTGCAGCACAGGGAGGAATC	135
		R: CCTGCTCCGTTCATGTAGTGG	
<i>MT-CYB</i>	Mitochondrially encoded cytochrome b	F: AACTTCGGCTCACTCCTTGG	83
		R: GCGTCTGGTGAGTAGTGCAT	
<i>MT-COI</i>	Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	F: ATACCAAACGCCCTCTTCG	116
		R: TGTTGAGGTTGCGGTCTGTT	
<i>DNM1L</i>	Dynamin 1-like	F: GCGGAAAGAGCTCAGTGCTA	156
		R: CTGCTTCCACCCCATTTCT	
<i>FBXO7</i>	F-box protein 7	F: CCGACGCTGGGGCATTG	73
		R: GGTATTAGAACTGTACCCCCAG	
<i>PARKIN</i>	Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	F: AAGGCCCTGTCAAAGAGTG	98
		R: CCAGCAAGATGGACCCTGG	
<i>PINK</i>	PTEN-induced putative kinase 1	F: CTGTCAGGAGATCCAGGCAAT	125
		R: AGCCCTTACCAATGGACTGC	
<i>OPA1</i>	Optic atrophy 1	F: TGCCTGACATTGTGTGGGAA	160
		R: TCCGGAGAACCTGAGGTAAA	
<i>OMA1</i>	OMA1 zinc metallopeptidase	F: TGCCTTCGTGCTTCAAATG	124
		R: AGCATGCCCAAGTACTGCAT	
<i>LC3B</i>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	F: GAAGTGGCTATCGCCAGAGT	156
		R: CTCTTTGTTTGAAGGTGCGG	
<i>ACTB</i>	actin, beta	F: ATGATGATATCGCCGCGCTC	132
		R: CCACCATCACGCCCTGG	
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: ACATCGCTCAGACACCATG	143
		R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	F: GCCGAGGAAAACCGTGTACT	109
		R: TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG	

5.8 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, EUA) e nível máximo de significância igual a 5% (erro α). Foi sempre testado se os dados de uma determinada análise seguiam as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variâncias, caso contrário os dados eram transformados (e.g., raiz quadrada, inversa, exponencial ou log). A maioria dos dados foi analisado por ANOVA de uma via seguido pelo teste de médias de Tukey. Nos casos em que mais de um fator foi considerado (e.g., grupo experimental e tratamento) os dados foram

analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de médias de Tukey. Os dados são apresentados no texto como médias seguidas do erro padrão da média. Em alguns casos o coeficiente de variação (CV) é apresentado como medida de dispersão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Derivação de iPSCs de pacientes com KSS

No primeiro experimento de derivação de iPSCs, foram utilizadas linhagens de fibroblastos representativas de cada grupo experimental (Controle, MELAS e KSS). Para geração de colônias de iPSCs, os fibroblastos foram incubados com partículas lentivirais portadoras do vetor STEMCCA, plaqueados sobre MEFs previamente tratadas com mitomicina e cultivados por 21 dias em meio de iPSCs, como descrito anteriormente. No vigésimo primeiro dia após o início da derivação as colônias que surgiram foram avaliadas quanto a morfologia e o tamanho (Tabela 3).

Tabela 3: Contagem e classificação das colônias de iPSCs após 21 dias de infecção.

D21	Colônias regulares	Colônias irregulares	Colônias iniciais	Total
Controle (mtDNA Selvagem)	4	7	56	67
MELAS	0	3	11	14
KSS	1	1	0	2

As colônias foram classificadas em categorias “regulares”, “irregulares”, e “iniciais”, levando em consideração a morfologia típica de iPSCs. Na categoria “regulares” foram incluídas as colônias homogêneas, com borda definida, dispendo de células justapostas e de tamanho reduzido em relação aos fibroblastos. Na categoria “irregulares”, as colônias que apresentavam células diferenciadas e sem borda definida. Por fim, as colônias em desenvolvimento foram classificadas como “iniciais”.

O grupo Controle apresentou a maior eficiência de formação de colônias, totalizando 67 colônias (Tabela 3). Destas, quatro foram classificadas como “regulares” e 56 como “iniciais”. Já com relação ao grupo MELAS, observou-se a formação de 3 colônias classificadas como irregulares e outras 11 colônias em fase inicial de formação. Por fim, o grupo KSS apresentou somente duas colônias, sendo uma regular e outra irregular, sendo que uma destas apresentou morfologia e tamanho condizente com o esperado para uma

colônia de iPSCs. Esses resultados estão de acordo com nossas expectativas e confirmam a tendência de que a formação de colônias é mais eficiente no grupo Controle.

Após a classificação apresentada na tabela 3, as colônias consideradas regulares foram selecionadas e repicadas separadamente em novas placas de cultivo para estabelecer as linhagens de iPSCs. As colônias consideradas iniciais foram acompanhadas diariamente por mais 30 dias com o intuito de que essas se desenvolvessem o suficiente para serem analisadas e/ou repicadas. Durante esse período também foi observado o surgimento de novas colônias nos grupos KSS e Controle, as quais foram escolhidas de acordo com os mesmos critérios de classificação apresentados na Tabela 3.

Nas células do grupo Controle obtivemos sucesso no estabelecimento de duas linhagens (colônias 1 e 2) que foram repicadas até a P9, momento em que foram criopreservadas. Essas colônias apresentaram cinética de crescimento e morfologia comparáveis ao controle de derivação utilizando fibroblastos humano BJ, conforme recomendação do fabricante do kit STEMCCA. Nas células do grupo KSS, quatro linhagens (colônias 2, 3, 4 e 5) demonstraram crescimento e morfologia comparáveis ao grupo Controle e foram cultivadas até as passagens 6 a 11, dependendo da linhagem. Nesta etapa, as colônias estavam regulares e as linhagens de iPSCs estabelecidas, o que nos permitiu prosseguir com as análises de caracterização, cópias de mtDNA e heteroplasmia. No entanto, não foi possível estabelecer nenhuma linhagem iPSC do grupo MELAS uma vez que as colônias inicialmente formadas não se desenvolveram após o repique.

6.1.1 Fosfatase Alcalina

Todas as colônias do grupo Controle e do grupo KSS, marcaram positivamente para o teste de fosfatase alcalina, sendo que algumas dessas são apresentadas nas figuras 5 e 6. A marcação com fosfatase alcalina é um método tradicional para análise de células-tronco embrionárias. Essa marcação vem sendo utilizada baseada no fato de que a massa celular interna do embrião é altamente positiva para fosfatase alcalina, diferentemente do que é encontrado no trofoblasto do embrião no estágio de blastocisto. A medida que a massa celular interna se diferencia durante o desenvolvimento, a expressão de fosfatase alcalina diminui, evidenciando sua especificidade para células pluripotentes (STEFKOVÁ;

PROCHÁZKOVÁ; PACHERNÍK, 2015). Esses resultados dão indícios de que as colônias derivadas dos grupos KSS e Controle são de fato iPSCs.

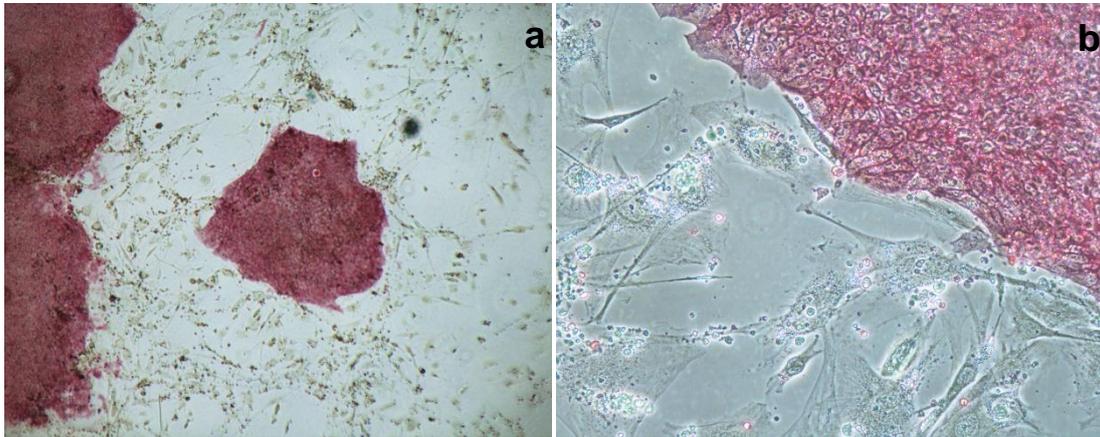


Figura 5: Resultado da atividade da fosfatase alcalina na colônia da linhagem Controle na P8. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina. **a:** Aumento de 40 x, **b:** Aumento de 200 x.

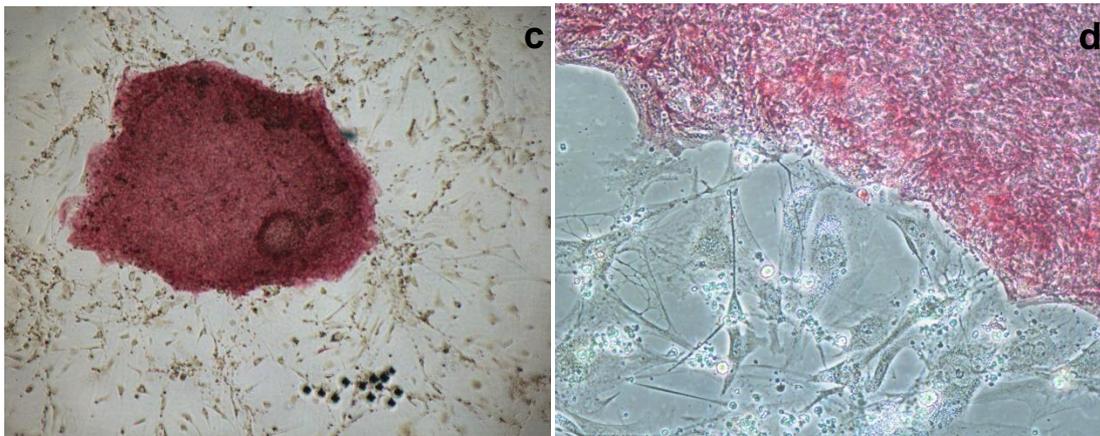


Figura 6: Resultado da atividade da fosfatase alcalina na colônia da linhagem KSS na P11. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina. **c:** Aumento de 40 x, **d:** Aumento de 200 x.

6.1.2 Análise do número de cópias de mtDNA e da heteroplasmia mitocondrial nos fibroblastos e nas colônias iPSCs

Ao analisar a quantidade de cópias de mtDNA nos fibroblastos e iPSCs (na P0) verificamos um efeito de interação ($P = 0,0468$) entre grupo (Controle ou KSS) e tipo celular (Fibroblasto ou iPSCs). O desdobramento desta interação indicou que KSS apresenta maior quantidade de cópias de mtDNA em iPSCs do que em fibroblastos (Figura 7). Não

houve diferença estatística para a quantidade de cópias de mtDNA no grupo Controle entre fibroblastos e iPSCs. Esses resultados não corroboram achados anteriores onde foi observado que a derivação de iPSCs resulta em diminuição do número de cópias de mtDNA (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b; PRIGIONE et al., 2010; SERIN et al., 2011).

No entanto, ao analisar a quantidade de cópias nas iPSCs ao longo das passagens, verificamos que o número de cópias de mtDNA no grupo KSS diminuiu ($P < 0,0001$) da P0 ($P0; 1241 \pm 36.63$) para a P5 (943 ± 16.77). No grupo Controle, o número de cópias se manteve estável durante o mesmo período.

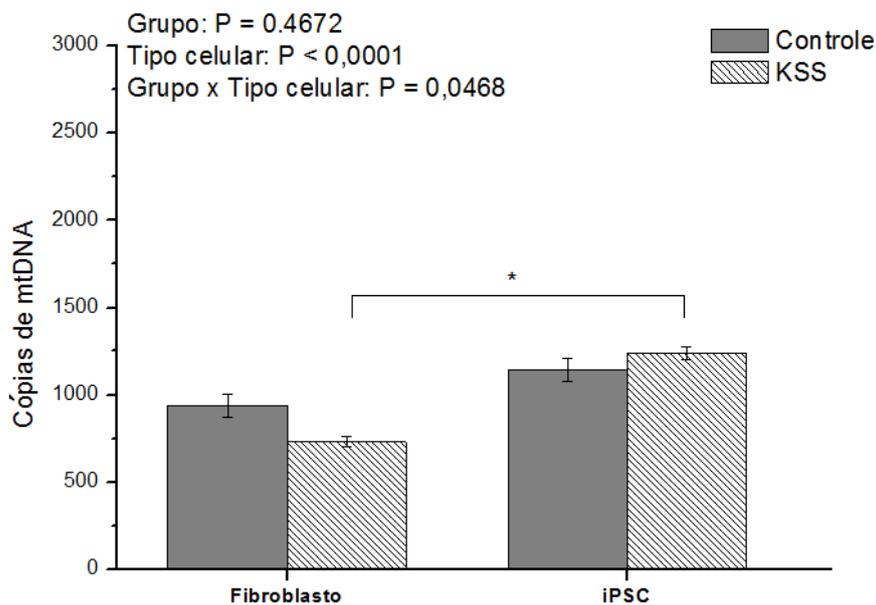


Figura 7: Quantidade de cópias de mtDNA por célula em fibroblastos (entre P2 e P10) e iPSCs derivadas do grupo Controle e do grupo KSS nas passagens iniciais (até P6).

Com relação a heteroplasmia, as linhagens de iPSCs KSS apresentaram níveis abaixo de 0,01% de deleção no mtDNA, como representado na Figura 8. Esse resultado foi surpreendente, uma vez que as células eram provenientes de um paciente que apresentava manifestação sintomatológica de KSS. No entanto, análises posteriores dos fibroblastos utilizados na derivação revelaram também baixa heteroplasmia ($2,9\% \pm 0,78$ de moléculas mutantes), o que pode explicar os valores da mutação encontrados nas linhagens de iPSCs.

O resultado de apenas $2,9\% \pm 0,78$ de moléculas mutantes nos fibroblastos também foi inusitado, uma vez que no momento da derivação os ensaios moleculares ainda estavam sendo desenvolvidos e foi tomado como referência o nível de 82,6% da mutação em tecido

muscular esquelético do paciente (MARIE S. K. N., 2001). A diferença encontrada nos fibroblastos indica uma grande variação inter-tecidual da mutação, o que está em acordo com relatos anteriores uma vez que o nível de heteroplasmia é influenciado pelo tipo de tecido, sendo comum não haver acúmulo em tecidos pós-mitóticos (BATTERSBY; LOREDO-OSTI; SHOUBRIDGE, 2003).

Além disso, é sabido que mutações no mtDNA só afetam a função de tecidos e do indivíduo quando presentes em elevada porcentagem, no geral acima de 60 a 80% nos casos de KSS (SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Embora as análises moleculares tenham sido realizadas com tecido muscular, era esperado que as linhagens de fibroblastos contivessem níveis mais elevados da mutação uma vez que o paciente apresentava manifestação fenotípica da desordem mitocondrial.

Portanto, a derivação neste trabalho de iPSCs KSS com baixos níveis da deleção no mtDNA pode ter sido causada pela formação preferencial de colônias a partir de fibroblastos praticamente homoplásmicos presentes numa população heterogênea (e.g., mosaico) inicial com média de $2,9\% \pm 0,78$ de moléculas mutantes.

No entanto, é possível observar que as colônias iPSCs apresentaram maior heteroplasmia ($P = 0,03$) quando analisadas na P0 ($0,000164\% \pm 0,00049217$) do que na P5 ($0,000023\% \pm 0,0000098657$), o que sustenta a hipótese de que a diminuição da heteroplasmia também tenha sido causada pela intensa replicação celular, levando a segregação de moléculas de mtDNA mutante e resultando em colônias livres da mutação. Embora a quantidade de mtDNA mutante detectada a partir da P1 esteja próxima do limite de detecção do nosso ensaio (estimado em $0,000003\%$), esse resultado está em acordo com outros trabalhos que também verificaram que a quantidade de mtDNA mutante em iPSCs diminui com o tempo (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013; FUJIKURA et al., 2012b).

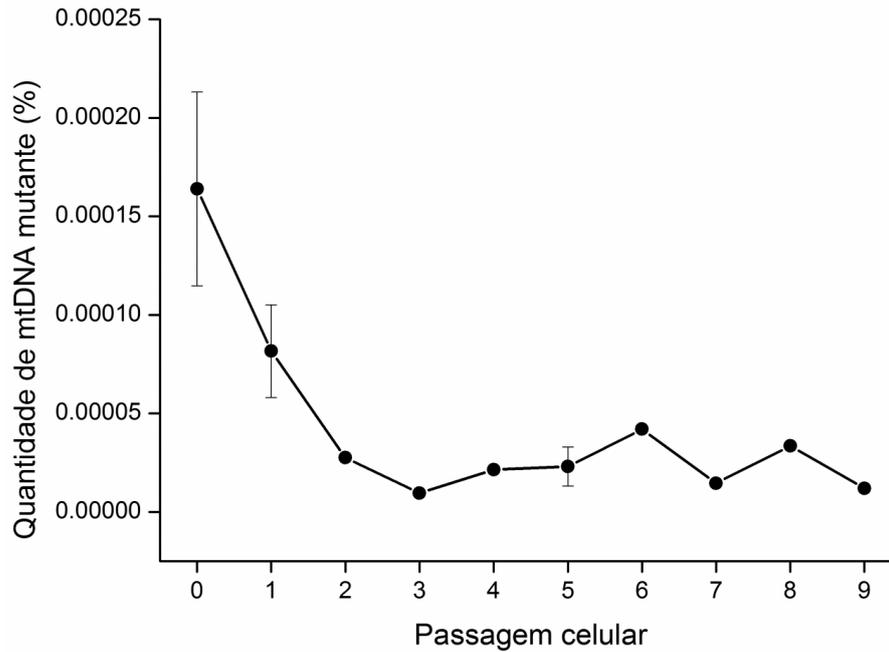


Figura 8: Quantidade de mtDNA mutante em relação à passagem celular das colônias iPSCs do grupo KSS.

Na tentativa de obter colônias iPSCs com nível mais elevado da mutação causadora de KSS, um segundo experimento foi realizado. Neste experimento, foram utilizados fibroblastos de outro paciente, também portador da mutação causadora de KSS, o qual apresentava nos fibroblastos níveis ligeiramente superiores da mutação (4,1%). No entanto, em consonância com nosso experimento anterior, as colônias iPSCs produzidas continham níveis muito baixos da mutação, os quais diminuíram ($P = 0,04$) da P0 (0,00458% \pm 0,001185) para a P1 (0,00007% \pm 0,000033).

Apesar do indício relevante de que a derivação e o cultivo de iPSCs a partir de pacientes com KSS promove a diminuição de moléculas mutantes, as colônias rapidamente chegaram a níveis indetectáveis da mutação e por isso impossibilitaram testar a hipótese principal deste trabalho. No entanto, vale ressaltar a importância da derivação de iPSCs livres da mutação a partir de pacientes portadores da síndrome de KSS, o que tem relevância para estudos básicos e aplicados.

6.2 Derivação de iPSCs de pacientes com MELAS

Para investigar em iPSCs a existência de um mecanismo que elimina as moléculas de mtDNA com mutações patogênicas era necessário obter colônias com níveis de mutação acima do encontrado para os pacientes com KSS. Desse modo, realizamos um terceiro experimento de derivação de iPSCs utilizando uma linhagem de fibroblastos de um paciente com MELAS (MELAS-paciente), uma linhagem proveniente da mãe desse mesmo paciente, a qual não apresentava sintomas da doença (MELAS-Portadora) e outra linhagem controle (mtDNA selvagem).

Dessa vez, com os ensaios de qPCR já padronizados, foi possível realizar a análise molecular dos fibroblastos utilizados antes do processo de derivação de iPSCs, o que indicou a presença de 99,2% de moléculas mutantes na linhagem do paciente (MELAS-paciente) e 92,6% na linhagem da mãe (MELAS-portadora).

Os fibroblastos passaram pelo processo de derivação de iPSCs, conforme descrito anteriormente e as colônias geradas foram avaliadas quanto a morfologia e o tamanho no vigésimo primeiro dia do protocolo (Tabela 4). As colônias foram classificadas em categorias “regulares”, “irregulares”, e “iniciais”, como descrito acima.

Tabela 4: Contagem e classificação das colônias de iPSCs após 21 dias de infecção.

D21	Colônias regulares	Colônias irregulares	Colônias iniciais	Total
Controle (mtDNA selvagem)	0	1	0	1
MELAS-paciente	1	1	0	2
MELAS-portadora	0	0	0	0

Inicialmente, verificamos que a quantidade de colônias geradas até o vigésimo primeiro dia, independente da linhagem utilizada, foi muito baixa, totalizando apenas 3 colônias (Tabela 4). Sendo que apenas a linhagem MELAS-paciente apresentou uma colônia com característica “regular” (Tabela 4).

Assim como no experimento anterior, todas as linhagens transduzidas foram acompanhadas por mais 30 dias para observar o surgimento de novas colônias. Após esse período, surgiram 5 novas colônias na linhagem MELAS-paciente. No entanto, as células da mãe do paciente (linhagem MELAS-portadora) não sobreviveram a transdução e consequentemente não geraram colônias mesmo depois de 51 dias após a transdução. Provavelmente isso se deve a linhagem apresentar morfologia e crescimento típicos de senescência celular, o que pode ser devido à idade avançada da paciente.

Todas as 6 colônias iPSCs do grupo MELAS-paciente (nomeadas de EDUSR1-6) foram repicadas individualmente em novas placas de cultivo. No entanto a única colônia iPSCs gerada no grupo Controle não sobreviveu a primeira passagem. Uma nova derivação apenas para o grupo controle foi realizada para obter iPSCs com mtDNA selvagem, resultando em duas colônias (CTL 1 e 2). A partir daí, as linhagens EDUSR 2, 5 e 6 e CTL1 e 2 foram selecionadas e mantidas em cultivo durante aproximadamente 11 meses, o que equivale a 25-30 passagens, dependendo da linhagem. Devido à características de auto renovação e diferenciação espontânea das iPSCs, foram necessários repiques semanais para mantê-las num estado pluripotente. Como esperado para células pluripotentes, as linhagens se mantiveram com o mesmo fenótipo e sem indícios de senescência celular durante o cultivo prolongado. Para facilitar o entendimento, o grupo MELAS-paciente será referido daqui em diante apenas como grupo MELAS.

6.2.1 Tratamento com Rapamicina durante a Derivação de iPSCs de Pacientes com MELAS

Paralelamente ao experimento apresentado anteriormente, em que realizamos a derivação de iPSCs a partir de um paciente portador da mutação causadora de MELAS, realizamos outro experimento testando o tratamento com Rapamicina durante todo o protocolo de derivação de iPSCs. A Rapamicina é um imunossupressor que inibe o complexo mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e pode ativar a mitofagia (GILKERSON et al., 2012).

O objetivo desse experimento foi verificar a ocorrência de mitofagia durante a reprogramação e a possível eliminação de mitocôndrias com mtDNAs mutantes. O tratamento foi baseado nos resultados apresentados por outros grupos (CHEN et al., 2011; DAI et al., 2014; GILKERSON et al., 2012) mostrando o efeito da Rapamicina na

eliminação de mitocôndrias disfuncionais e também na eficiência de reprogramação de iPSCs.

O estudo de Dai e colaboradores (DAI et al., 2014) mostrou que em híbridos contendo a mutação G11778A no mtDNA a rapamicina induziu a colocalização das mitocôndrias com autofagossomos, e resultou em uma diminuição progressiva nos níveis da mutação e restauração dos níveis de ATP nas células. Esses resultados corroboram os obtidos por Gilkerson e colaboradores, (GILKERSON et al., 2012) de que a mitofagia poderia ser induzida pelo tratamento com a rapamicina tanto em híbridos que continham grandes deleções no mtDNA quanto em células com mtDNA totalmente depletado. Além disso, evidências do papel benéfico da autofagia na reprogramação celular foram fornecidas por Chen et al. (2011) ao relatarem que o tratamento com rapamicina aumentou em cinco vezes a eficiência de reprogramação em iPSCs. Neste sentido, foi interessante investigar se em iPSCs derivadas de células portadoras de mutações patogênicas no mtDNA, a ocorrência de mitofagia durante a reprogramação celular poderia resultar em maior eficiência de derivação e eliminação seletiva de mitocôndrias com mtDNAs mutantes.

No entanto, ao realizar a derivação de iPSCs, não observamos efeito na eficiência de formação de colônias nos fibroblastos tratados com Rapamicina quando comparado com as mesmas linhagens sem o tratamento. Obtivemos sucesso na derivação de 6 colônias iPSCs do grupo com Rapamicina, denominadas EDUR1, 2, 3, 4, 5 e 6. No entanto, verificamos que o tratamento com rapamicina não afetou o nível da mutação no mtDNA, resultado em iPSCs com níveis similares aos encontrados nas iPSC MELAS não tratadas com rapamicina. Baseado nesse resultado decidimos não estender nossos estudos com essas linhagens e focar nossas próximas análises nas colônias não tratadas com rapamicina durante o protocolo de reprogramação.

6.2.2 Caracterização das linhagens de iPSCs

Todas as linhagens de iPSCs foram caracterizadas quanto a morfologia, por marcação com fosfatase alcalina (Figuras 9 e 10), e imunofluorescência para marcadores comumente utilizados na caracterização de células-tronco, SSEA3, NANOG, TRA-1-60 e

TRA-1-81 (figura 11 e 12) (CHERRY et al., 2013; FOLMES et al., 2013; KODAIRA et al., 2015).

Apesar de todas as linhagens apresentarem morfologia típica de iPSCs, foi possível notar que as colônias do grupo MELAS crescem de modo tridimensional enquanto que as colônias do grupo Controle formam monocamadas. Essa diferença pode ser observada nos resultados de fosfatase alcalina, por exemplo (Figura 9 e 10). Não foram encontrados relatos de iPSCs MELAS com formato tridimensional na literatura, no entanto as colônias de iPSCs derivadas por Hämäläinen e colaboradores (2013), com alta taxa da mesma mutação causadora de MELAS assemelham-se as colônias derivadas neste trabalho (Figura 12).

Além do formato tridimensional, as colônias do grupo MELAS apresentam crescimento lento quando comparadas com o grupo Controle. Essa discrepância é clara nas imagens abaixo, aonde as colônias de ambos os grupos estão com o mesmo tempo de repique (Figuras 9 e 10, 11 e 12).

Todas as colônias de iPSCs marcaram positivamente para o teste de fosfatase alcalina (Figuras 9 e 10). Esse resultado foi confirmado por imunofluorescência (Figuras 11 e 12), aonde todas as colônias marcaram para indicadores de pluripotência (SSEA3, NANOG, TRA-1-60 e TRA-1-81). É possível observar que a marcação foi específica para as colônias de iPSCs em ambos os grupos, e que não houve marcação das MEFs presentes ao redor da colônia.

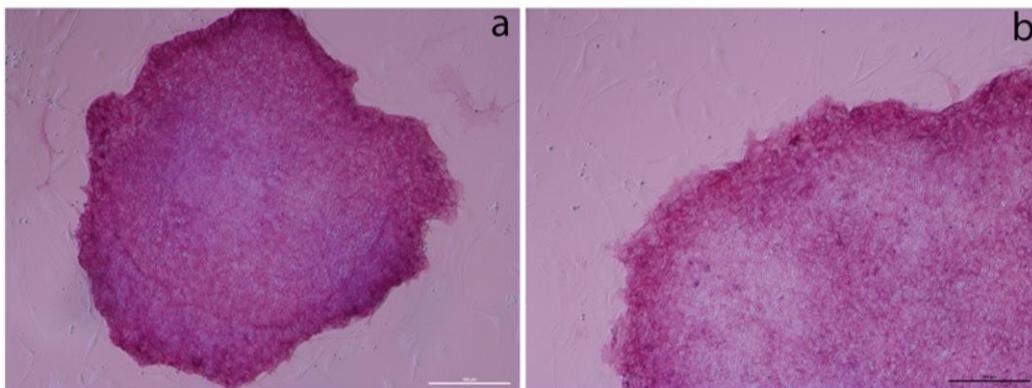


Figura 9: Resultado da atividade da fosfatase alcalina para iPSCs do grupo **Controle** na P22. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina. **a:** Aumento de 40 x, **b:** Aumento de 200 x.

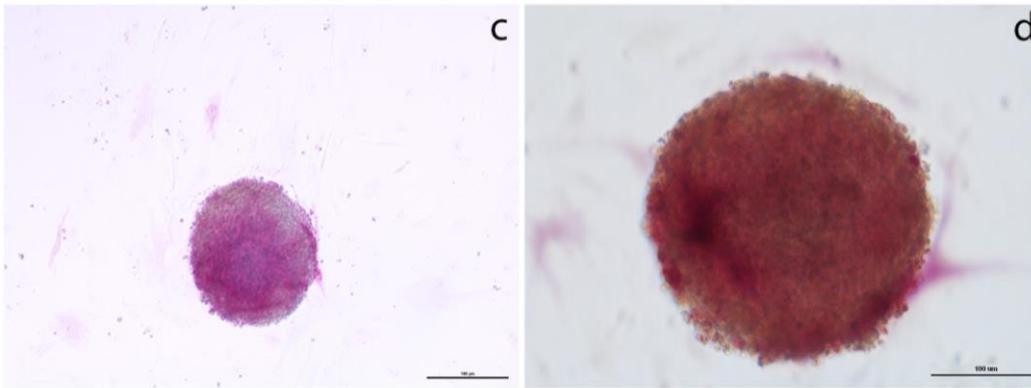


Figura 10: Resultado da atividade da fosfatase alcalina na iPSCs do grupo **MELAS** na P30. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina. **c:** Aumento de 40 x, **d:** Aumento de 200 x.

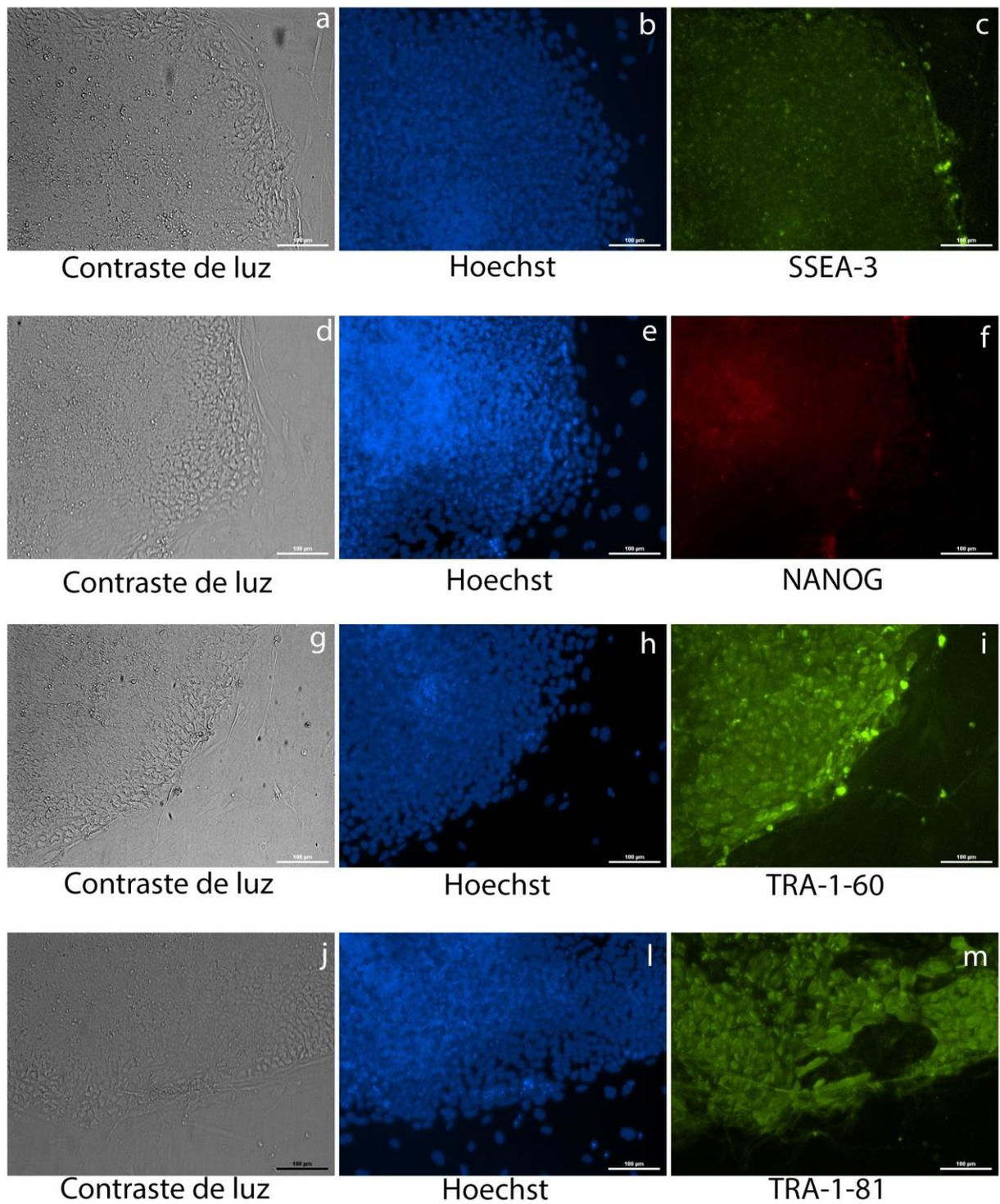


Figura 11: Resultado de imunofluorescência em iPSCs do grupo **Controle** para marcadores comumente utilizados na caracterização de células-tronco, SSEA3, NANOG, TRA-1-60 e TRA-1-81. Aumento de 200 x.

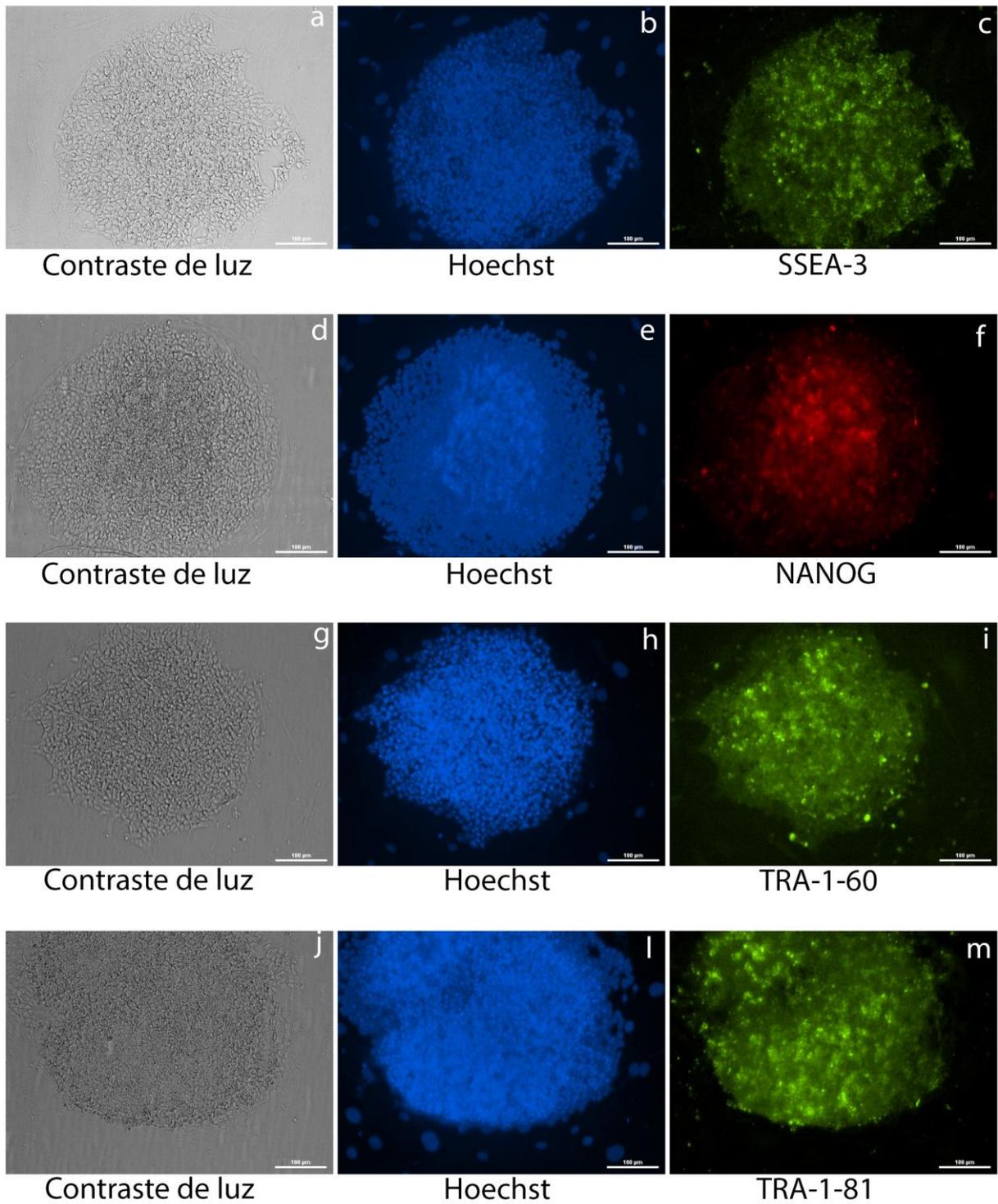


Figura 12: Resultado de imunofluorescência em iPSCs do grupo **MELAS** para marcadores comumente utilizados na caracterização de células-tronco, SSEA3, NANOG, TRA-1-60 e TRA-1-81. Aumento de 200 x.

6.2.3 Análise do número de cópias de mtDNA

Após o cultivo prolongado e a caracterização das colônias iPSCs, foram realizadas as análises da quantidade de cópias de mtDNA nas linhagens de fibroblastos e nas colônias iPSCs de ambos os grupos.

A análise estatística indicou efeito ($P = 0,0126$; Figura 13) de interação entre grupo (MELAS ou Controle) e tipo celular (iPSCs ou fibroblastos). O grupo MELAS apresentou maior quantidade de cópias de mtDNA ($P = 0,0009$) em iPSCs do que na linhagem de fibroblastos. Verificamos também que há mais que o dobro ($P < 0,0001$) da quantidade de mtDNA nas iPSCs de MELAS quando comparado com iPSCs do grupo Controle (Figura 13). Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre fibroblastos e iPSCs do grupo Controle.

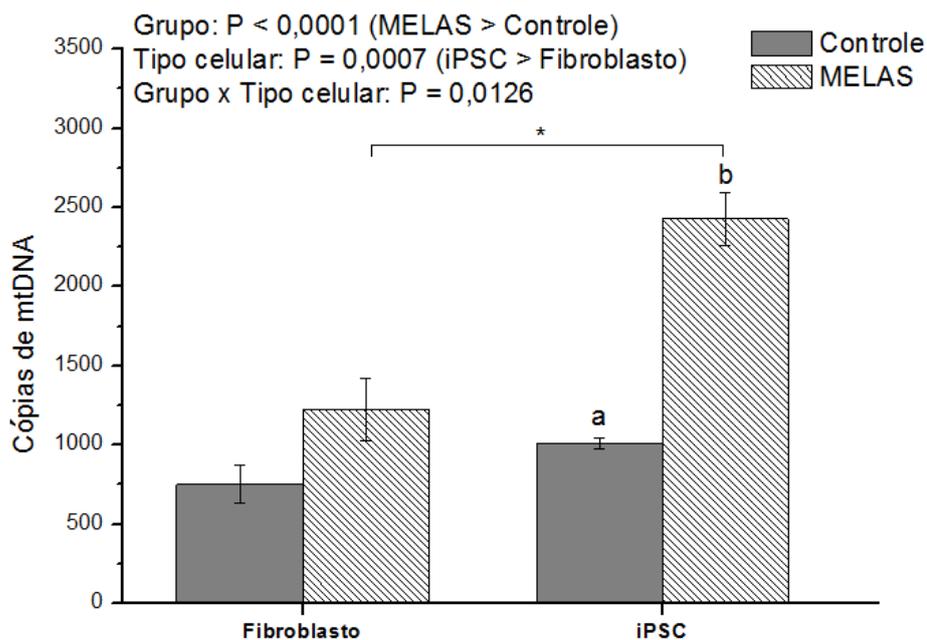


Figura 13: Quantidade de cópias de mtDNA por célula em fibroblastos (ambos na P4) e iPSCs derivadas do grupo Controle (P25) e do grupo MELAS (P30).

Na tentativa de investigar melhor o aumento de mtDNA nas iPSCs do grupo MELAS analisamos a quantidade de cópias de mtDNA ao longo do cultivo (Figura 14). O resultado desta análise mostrou que a quantidade de cópias de mtDNA variou ao longo das passagens, sendo que a P15 apresentou maior quantidade de cópias de mtDNA ($4182,23 \pm 292,35$), valor que é quase quatro vezes maior do que o encontrado para o cultivo de fibroblastos MELAS ($1226,05 \pm 197,42$).

Os motivos para essa variação não estão claros, mas podem estar relacionados à

seleção natural ou mesmo à seleção humana (e.g., artificial) ao longo de passagens. Além disso, é sabido que as células se adaptam ao longo do tempo em condições de cultivo, adaptações em curto prazo devido à mudanças na regulação e expressão de vários genes e mais tarde através da aquisição de mudanças genéticas e provavelmente alterações epigenéticas (HUSSEIN et al., 2011).

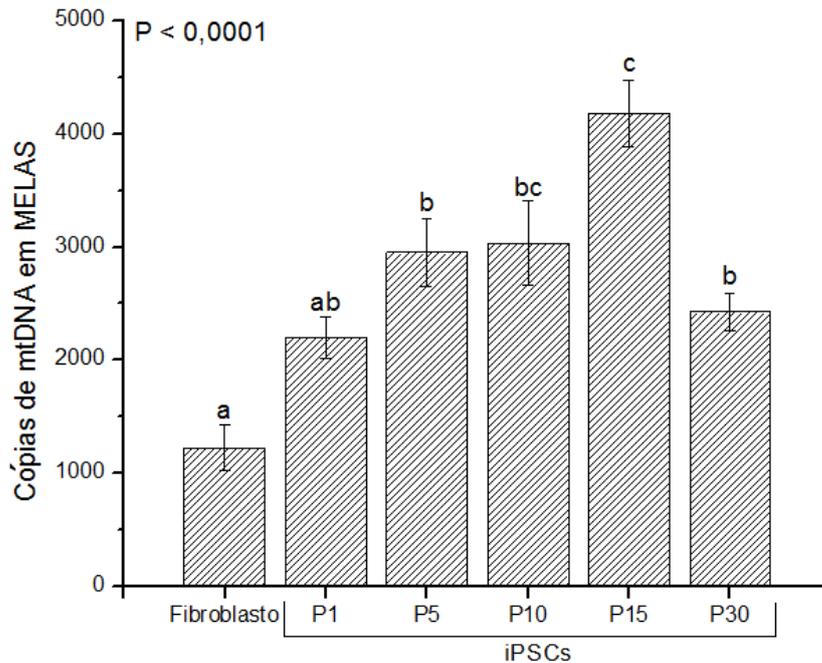


Figura 14: Quantidade de cópias de mtDNA na linhagem de fibroblasto e colônias iPSCs do grupo MELAS durante o cultivo (P1, P5, P10, P15 e P30).

Ao realizar o mesmo tipo de análise no grupo Controle (Figura 15) verificamos que a quantidade de cópias de mtDNA também oscila ao longo do cultivo. Essa variação se assemelha à observada nas iPSC MELAS, indicando que ambos os grupos aumentaram o número de cópias durante as primeiras passagens seguido por uma diminuição nas passagens seguintes. No entanto, o nível mais elevado de mtDNA observado para o grupo controle, na P10 ($1501,72 \pm 1,63$), é pelo duas vezes menor do que o maior nível de mtDNA observado no grupo MELAS.

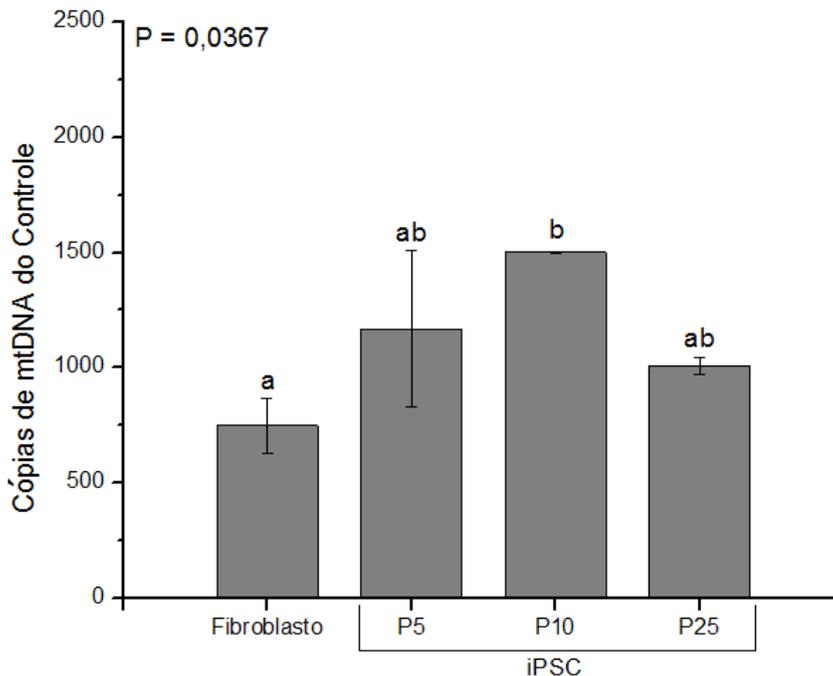


Figura 15: Quantidade de cópias de mtDNA na linhagem de fibroblasto e colônias iPSCs do grupo Controle durante o cultivo (P5, P10, P25).

Os resultados acima chamam a atenção para a presença de uma maior quantidade de mtDNA nas iPSC em relação aos fibroblastos. Além disso, a quantidade de mtDNA é maior nas iPSC MELAS do que nas Controle, apesar de haver uma tendência de diminuição do número de cópias a medida que o cultivo avança. Esses resultados não estão em acordo com achados anteriores de que tanto iPSCs quanto ESC possuem baixa quantidade de mtDNA em relação a células somáticas (BUKOWIECKI; ADJAYE; PRIGIONE, 2014). No entanto, a quantidade de cópias de mtDNA parece ser dependente da quantidade de moléculas mutantes presentes nas iPSCs. Hamalainen et al. (2013) e Kodaira et al. (2015) encontraram que iPSCs contendo elevadas quantidades de mtDNA mutante para MELAS contêm níveis elevados de cópias de mtDNA se comparado com iPSC com baixos níveis da mutação ou mesmo iPSC com mtDNA selvagem.

Interessantemente, o mesmo foi encontrado em embriões portadores da mutação A3243G causadora de MELAS. Monnot e colaboradores (2013) relataram um aumento gradual na quantidade de mtDNA entre oócitos (na fase de vesícula germinativa) e blastocistos, o que segundo os autores pode ser considerado um mecanismo adaptativo à deficiência respiratória induzida por níveis elevados da mutação (MONNOT et al., 2013).

Portanto, é provável que a replicação do mtDNA nas iPSCs do grupo MELAS esteja elevada devido a quantidade de moléculas mutantes presentes. Já foi demonstrado que mitocôndrias disfuncionais enviam sinais para o núcleo, que por sua vez estimula a

replicação mitocondrial (CHIARATTI; MEIRELLES, 2006; MISHRA; CHAN, 2014; SCHON; DIMAURO; HIRANO, 2012). Esta suposição corrobora os nossos dados de expressão gênica nas iPSCs, os quais indicam haver um aumento da quantidade de transcritos codificados pelo mtDNA (vide resultados abaixo). Uma vez que a replicação do mtDNA está acoplada à transcrição (STEWART; CHINNERY, 2015), um aumento da transcrição do mtDNA poderia ter resultado num aumento também da sua replicação.

No entanto, é difícil explicar porque os níveis de mtDNA estão elevados nas iPSC MELAS e não nos fibroblastos. É sabido que a reprogramação genética pela qual as células passam para atingirem o estado de pluripotência está associada a uma reprogramação metabólica que resulta na mudança de um metabolismo preferencialmente oxidativo (comum nos fibroblastos) para glicolítico nas iPSCs (PRIGIONE et al., 2010). Neste sentido, era esperado que as iPSC se mostrassem menos sensíveis à mutação mitocondrial do que os fibroblastos, o que não condiz com o aumento do número de cópias nas iPSCs MELAS.

6.2.4 Análise de heteroplasmia

Com relação à heteroplasmia, todas as colônias de iPSCs apresentaram alta quantidade de moléculas mutantes (> 98%) após a derivação. Embora as colônias tenham sido derivadas de fibroblastos contendo 99,2% de moléculas mutantes era esperado que a derivação resultasse em colônias com quantidade alta, porém variada da mutação, como demonstrado por Yokota e colaboradores. Esses autores, obtiveram iPSCs com níveis de 50% a 100%, (sendo a maioria 100%) ao utilizarem uma linhagem contendo 99% da mutação A3243G (YOKOTA et al., 2015). Isso porque possivelmente os fibroblastos utilizados apresentavam níveis variados da mutação (FOLMES et al., 2013). Ou devido a uma seleção negativa dirigida às moléculas mutantes no momento da reprogramação (HÄMÄLÄINEN et al., 2013; STEWART et al., 2008c).

Portanto, nesse trabalho não houve indícios de segregação de moléculas mutantes no momento da reprogramação, resultando em colônias com níveis acima de 98% após a indução a pluripotência. Isso indica que as células do paciente utilizado não continham níveis variados da mutação.

Posteriormente, levando em consideração resultados apresentados por outros grupos (CHERRY et al., 2013b; FOLMES et al., 2013) de que o estabelecimento e cultivo prolongado resulta na diminuição na heteroplasmia em iPSCs derivadas de pacientes com

doenças mitocondriais, avaliamos a quantidade de moléculas mutantes ao longo de 30 passagens.

Como apresentado na figura 16, houve diminuição da heteroplasmia ($P = 0,0146$) durante o cultivo de iPSCs do grupo MELAS, sendo que na P5 a quantidade de moléculas mutantes era de $99,28\% \pm 0,08$, diferentemente do encontrado na P30, $98,51\% \pm 0,17$. Apesar de baixa, a queda da heteroplasmia sugere que o mtDNA mutante é negativamente selecionado durante a rápida proliferação das células das colônias iPSCs. Essa seleção pode estar ocorrendo a nível celular ou por outros mecanismos moleculares, como por exemplo por mitofagia (CHEN et al., 2011; HÄMÄLÄINEN et al., 2013). No entanto, o cultivo por mais passagens é necessário para esclarecer este achado.

Esses resultados corroboram os dados apresentados por Cherry et al. (2012), bem como os dados de Folmes et al. (2013), tornando as colônias obtidas neste trabalho um modelo que permite explorar os efeitos da heteroplasmia nas células iPSCs específicas de paciente mitocondriais.

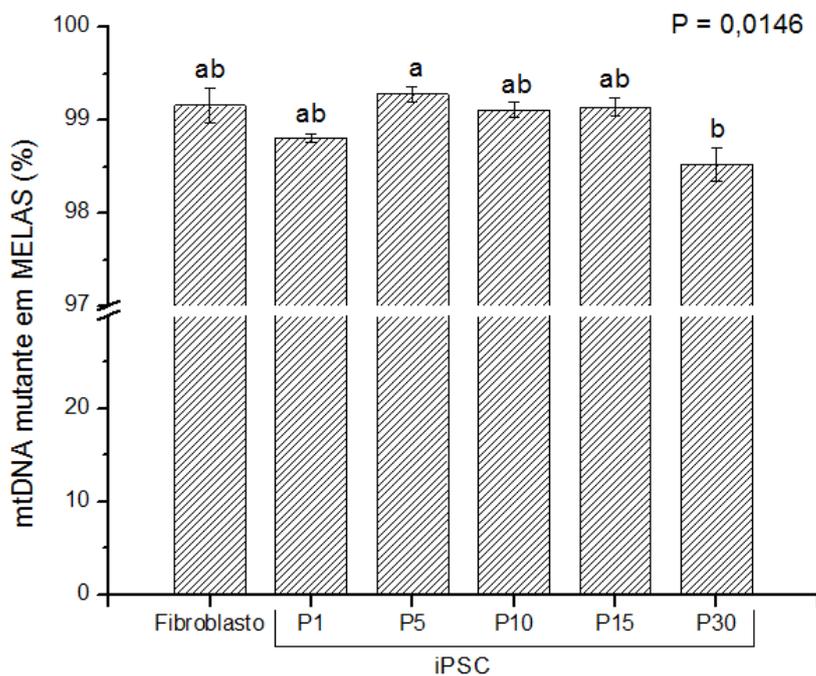


Figura 16: Quantidade de mtDNA mutante em relação à passagem celular na linhagem de fibroblastos e colônias iPSCs do grupo MELAS.

6.2.5 Resultados de Imunofluorescência

Com objetivo de encontrar indícios de mecanismos autofágicos nas iPSCs derivadas de pacientes com MELAS decidimos analisar as colônias iPSCs por imunofluorescência quanto a presença de autofagossomos e a colocalização com mitocôndrias. Os primeiros experimentos (Figura 17) indicavam que os resultados seriam promissores, pois mostravam que a quantidade de autofagossomos era maior nas iPSCs MELAS em relação a iPSCs Controle. Além disso, conforme o esperado as iPSCs MELAS apresentavam menor potencial de membrana mitocondrial (figura 17). No entanto, a repetição desse experimento, bem como a realização de outras análises utilizando diversos anticorpos para outras proteínas (TOMM20, PARKIN, SDHA, OPA1, MFN1, MFN2) revelou um padrão de imagem diferente nas iPSCs do grupo MELAS. Ao contrário do grupo Controle, as colônias iPSCs MELAS possuíam, na maioria das vezes, maior quantidade de marcação nas bordas das colônias do que no centro. Esse resultado foi considerado correto nos primeiros experimentos, uma vez que é sabido que colônias iPSCs podem apresentar bordas com células que tendem a se diferenciar em relação ao centro da colônia (BUKOWIECKI; ADJAYE; PRIGIONE, 2014). Porém, a análise mais detalhada das imagens para os diversos anticorpos mencionados mostrou que a diferença de morfologia das iPSCs MELAS (tridimensional) em relação com o Controle (monocamada) poderia estar afetando a marcação no centro das colônias no caso do grupo MELAS. Por esse motivo não foi possível utilizar os resultados de imunofluorescência para uma análise comparativa quanto a presença de mecanismos autofágicos nas iPSCs derivadas neste trabalho.

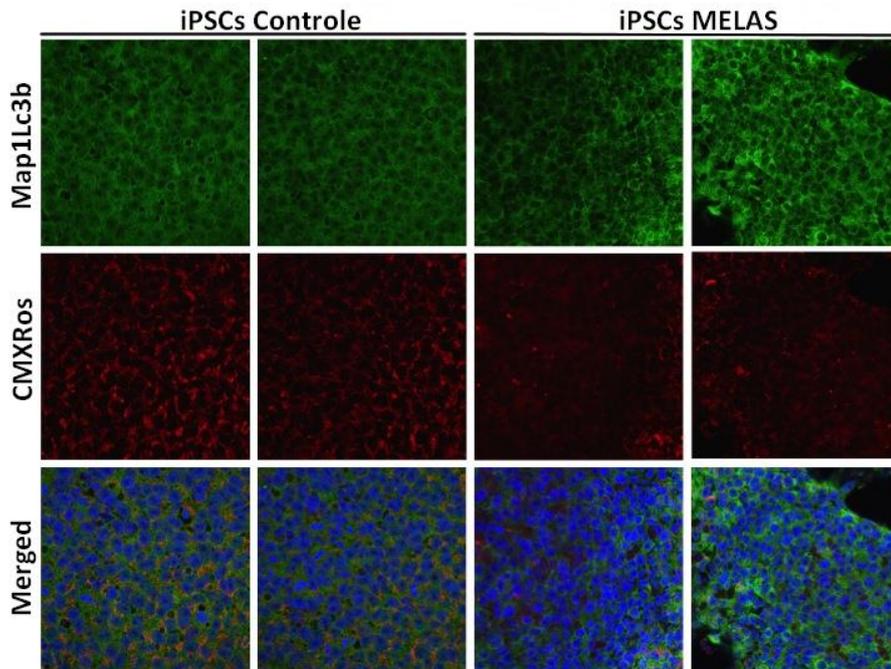


Figura 17: Resultado de imunofluorescência em iPSCs dos grupos **MELAS** e **Controle**. O potencial de membrana mitocondrial foi visualizado pela marcação com MitoTracker Red CMXRos e os autofagossomos foram visualizados por imunofluorescência contra a proteína Map1Lc3b. As fotos foram obtidas em microscópio confocal utilizando a objetiva de 63X.

6.2.6 Expressão Gênica de iPSCs MELAS tratadas com Rapamicina e mdivi-1

A partir dos resultados de heteroplasmia apresentados anteriormente e devido as dificuldades técnicas enfrentadas nas análises por imunofluorescência, decidimos investigar a existência de mecanismos autofágicos através do perfil de expressão gênica das iPSCs. Além de avaliar o efeito da alta heteroplasmia do grupo MELAS, analisamos o efeito do tratamento com promotor (rapamicina) e inibidor (mdivi-1) de autofagia.

Ao analisar a expressão dos transcritos que codificam subunidades do Complexo I (MT-ND2), II (SDHA), III (MT-CYB) e IV (MT-CO1) verificamos que esses encontram-se, no geral, mais expressos em iPSCs MELAS em relação ao Controle (Figuras 18, 19, 20 e 21). Como a transcrição do mtDNA é policistrônica (STEWART; CHINNERY, 2015) era esperado um aumento em conjunto dos mRNAs codificados pelo mtDNA (complexos I, III e IV).

Esses resultados corroboram os dados de cópias de mtDNA, uma vez que as iPSCs MELAS estão sob efeito da mutação, o que resulta num aumento da transcrição e replicação,

condizente com o que é observado em pacientes com doenças mitocondriais (HÄMÄLÄINEN et al., 2013). Esse efeito foi principalmente evidente no caso da SDHA (complexo II) que é codificada pelo núcleo e sua expressão elevada é comumente utilizada para o diagnóstico de doenças mitocondriais (WONG et al., 2010). Normalmente, em paciente com doenças mitocondriais, observa-se um aumento da proteína SDHA e uma diminuição da MT-CO1. A diminuição da MT-CO1 é explicada pelo defeito que MELAS causa sobre a síntese proteica mitocondrial por afetar o tRNA-leu. Como aqui analisamos a quantidade de transcritos e não de proteínas, não observamos tal efeito sobre a MT-CO1.

Com relação ao efeito dos tratamentos com rapamicina e mdivi-1, não verificamos uma resposta clara destes sobre a expressão de genes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons. Nossa intenção com esses tratamentos era estimular/desestimular a autofagia. No entanto, uma vez que a quantidade de mutação nas iPSCs MELAS é muito elevada, o estímulo autofágico em nada deve ter contribuído para minimizar a disfunção mitocondrial, o que explica porque os tratamentos não revelaram um padrão de expressão para estes genes.

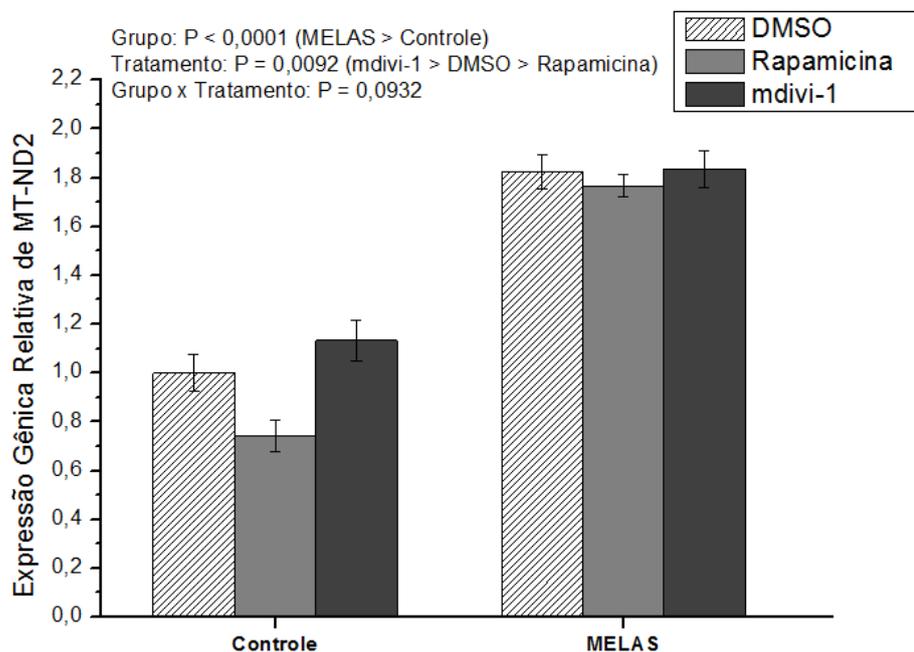


Figura 18: Expressão relativa de MT-ND2 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$), sendo a expressão de MT-ND2 maior no grupo MELAS e efeito de tratamento ($P = 0,0092$), sendo a expressão de MT-ND2 maior no tratamento com mdivi-1, do que no grupo DMSO que por sua vez foi maior que no grupo Rapamicina.

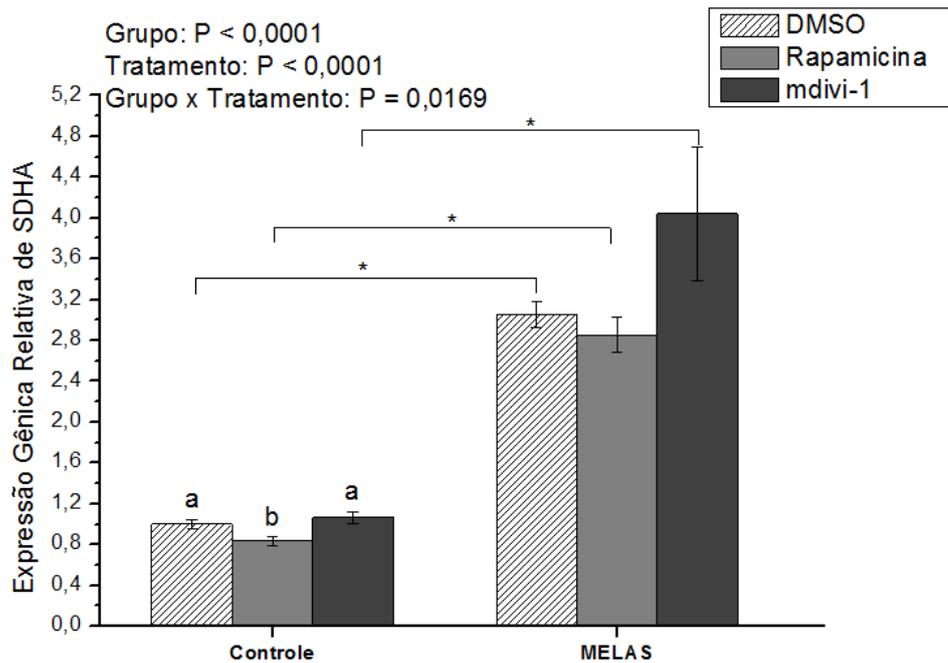


Figura 19: Expressão relativa de SDHA em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de interação Grupo X tratamento ($P = 0,0169$).

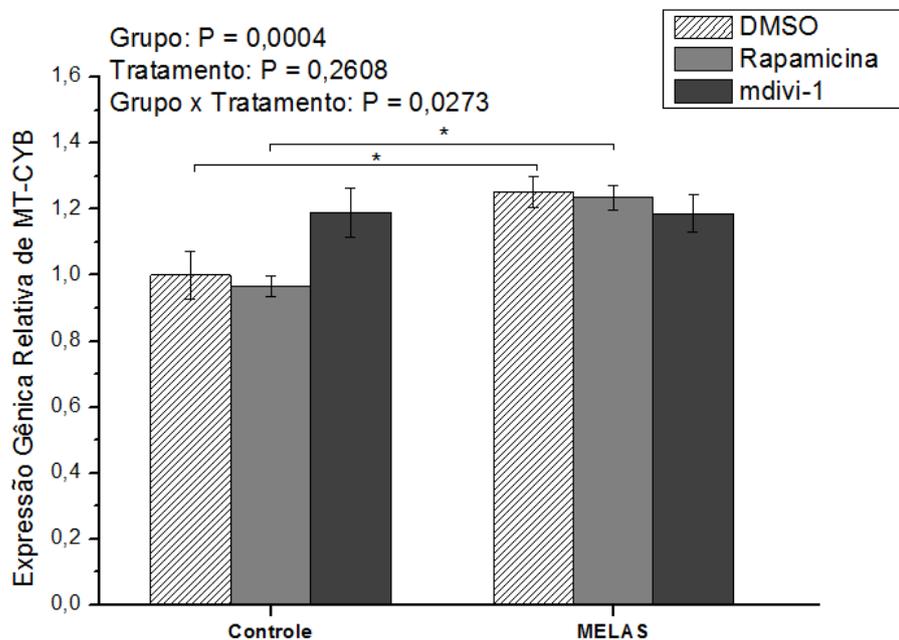


Figura 20: Expressão relativa de MT-CYB em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de interação Grupo X tratamento ($P = 0,0273$).

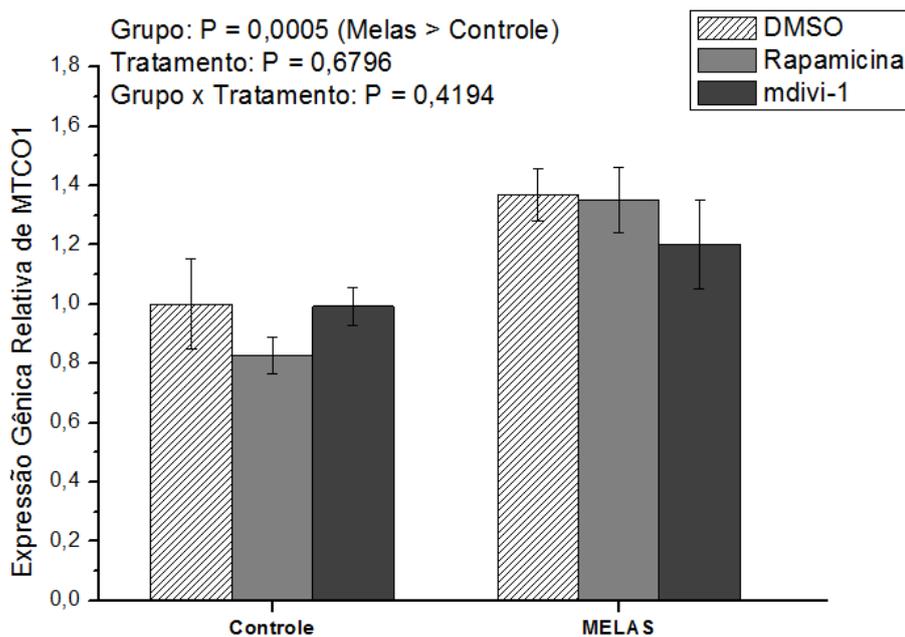


Figura 21: Expressão relativa de MTCO1 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de Grupo ($P = 0,0005$) sendo a expressão de MTCO1 maior no grupo MELAS.

Ao avaliar a expressão dos transcritos que codificam PINK1 e PARKIN (Figuras 22 e 23) verificamos que PINK está menos expressa em iPSCs do grupo MELAS em relação ao Controle. As proteínas PINK e PARKIN são essenciais para o processo de mitofagia (GILKERSON et al., 2012; LAZAROU et al., 2015). Em condições de estresse, como por exemplo, despolarização mitocondrial, PINK1 acumula na superfície da mitocôndria e faz com que haja a importação da proteína PARKIN do citosol (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). Isso leva a poli-ubiquitinação de várias outras proteínas da membrana mitocondrial (e.g., MFN1, TOMM20), o que faz com que haja reconhecimento da maquinaria autofágica, provocando a degradação específica da mitocôndria (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). Apesar de curioso num primeiro momento, o resultado encontrado pode demonstrar um baixo estímulo para produção de transcritos de PINK1 nas iPSCs de MELAS, possivelmente causado pelo acúmulo da proteína PINK1 na mitocôndria. Essa suposição é sustentada ao verificar que PARKIN encontra-se quase três vezes mais expressa em MELAS em relação ao Controle ($P < 0,0001$). Além disso, uma vez que PARKIN está a posteriori em relação a PINK na cadeia de regulação da mitofagia (GILKERSON et al., 2012), a superexpressão de PARKIN por si só já indica um estímulo autofágico dirigido à mitocôndria. Como relatado por Gilkerson et al. (2012) a superexpressão de PARKIN em

células Rho 0 (sem mtDNA) foi suficiente para induzir a destruição autofágica das mitocondrias disfuncionais. Outro trabalho realizado por Suen et al. (2010) revelaram que a super expressão induzida de PARKIN em cíbridos (citoplasma híbrido) reduz o nível da mutação patogênica em aproximadamente 20% para uma mutação no gene mitocondrial *MT-COI*(SUEN et al., 2010).

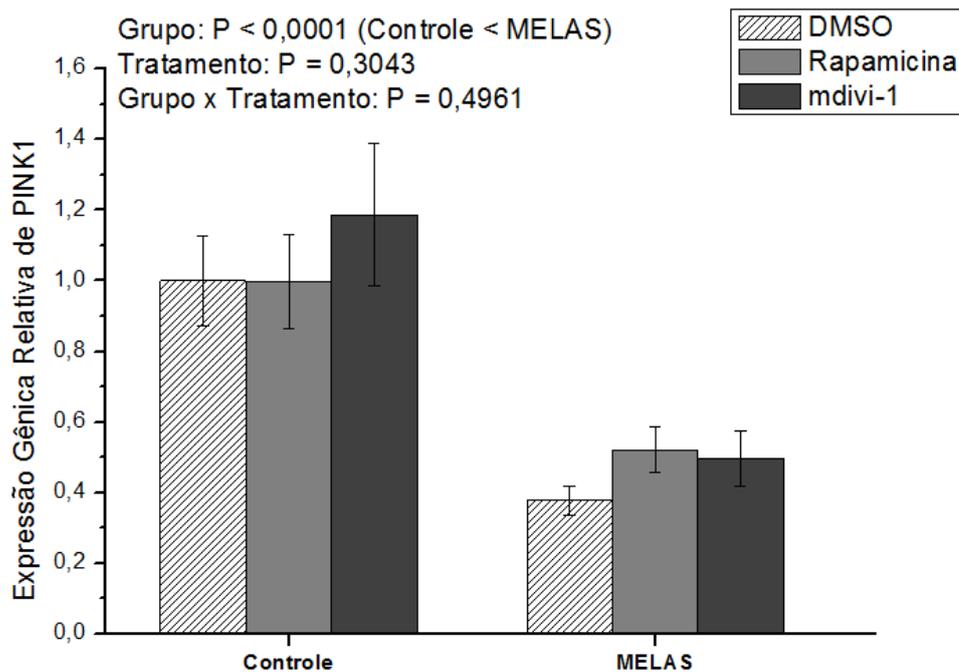


Figura 22: Expressão relativa de PINK1 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$) sendo a expressão de PINK1 maior no grupo MELAS.

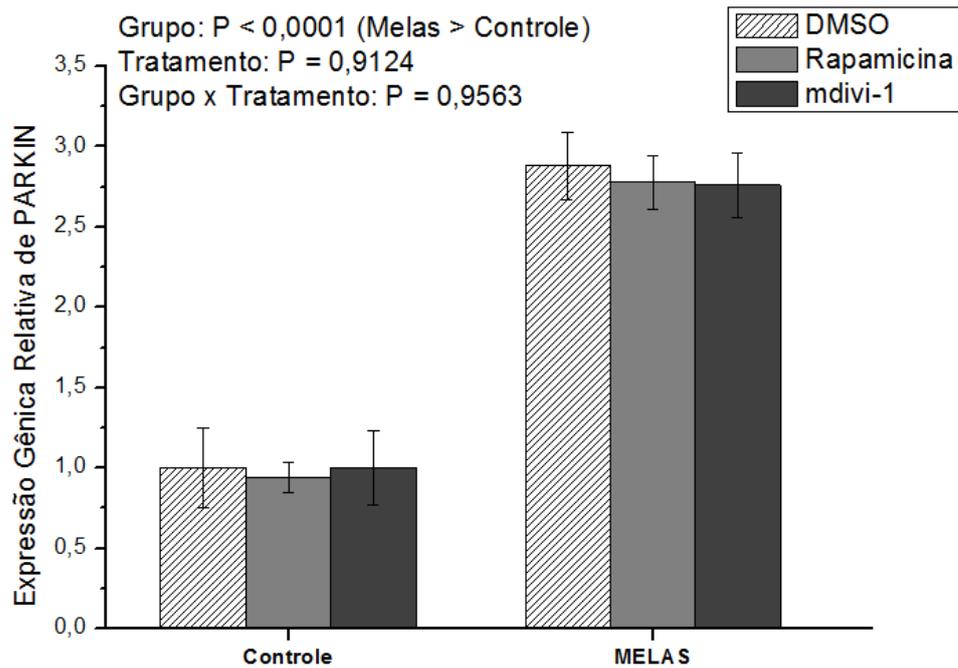


Figura 23: Expressão relativa de PARKIN em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$) sendo a expressão de PARKIN maior no grupo MELAS.

Portanto, esses resultados indicam um estímulo autofágico nas iPSCs do grupo MELAS. Para confirmar esse efeito, avaliamos a expressão de DNM1L e OPA1, os quais desempenham papel central na dinâmica mitocondrial (Figura 24 e 25). A superexpressão da DNM1L encontrada nas iPSCs de MELAS indica uma possível condição de fragmentação mitocondrial, o que é condizente com uma maior ocorrência de mitofagia nesse grupo. Como revelado por Twig et al. (2008), a fragmentação mitocondrial é essencial para que os autofagossomos possam engolfar mitocôndrias fadadas à destruição nos lisossomos. Além disso, verificamos que o tratamento com Rapamicina fez com que as células tanto do grupo Controle quanto do grupo MELAS tivessem menor quantidade de transcritos para DNM1L. (Figura 24).

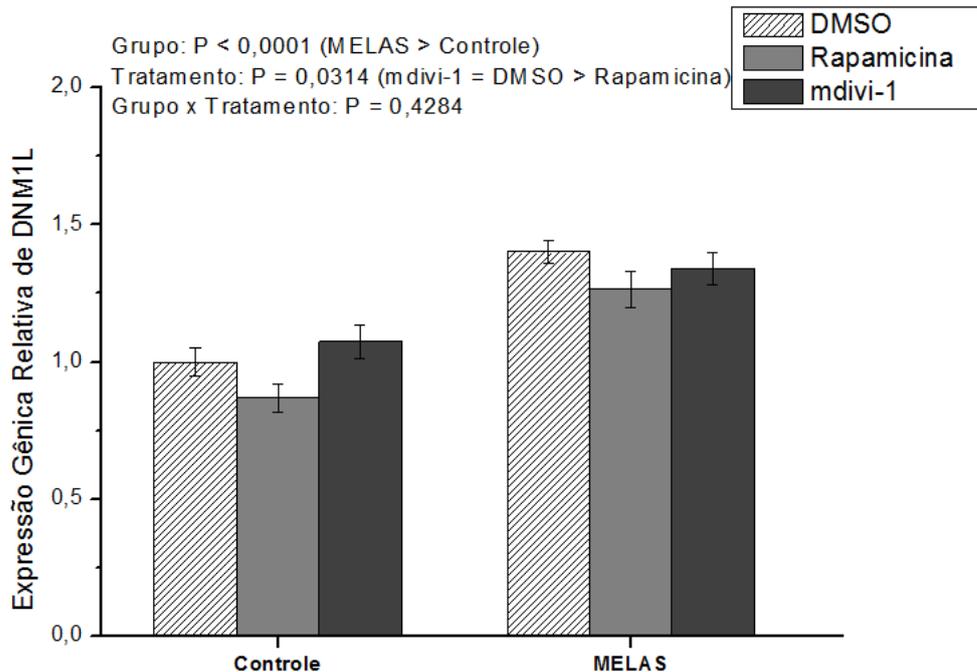


Figura 24: Expressão relativa de DNM1L em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$) sendo a expressão de PARKIN maior no grupo MELAS. Foi observado efeito de tratamento ($P = 0,0314$) sendo mdivi-1 e DMSO maior que Rapamicina.

Com relação a análise da OPA1, responsável por mediar a fusão das membranas interna da mitocôndria, essa também se mostrou aumentada no grupo MELAS (Figura 25). Esse resultado é paradoxal uma vez que esperamos encontrar uma baixa expressão de OPA1 indicando um possível deslocamento da razão fusão/fissão no sentido da fissão mitocondrial. Mas como demonstrado por Chen et al. (2005) entre outros (CIPOLAT et al., 2004; OLICHON, 2003), a superexpressão de OPA1 também resulta em fragmentação mitocondrial, e portanto suportam a suposição de que há maior ocorrência de mitofagia no grupo iPSCs MELAS. Além disso, trabalhos recentes demonstraram que a OPA1 está também envolvida no processo autofágico (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). A OPA1 tem 8 isoformas diferentes, e sua forma completa é conhecida como L-OPA1, porém em condições de estresse a L-OPA1 pode ser clivada por uma mitoprotease chamada OMA1. A completa clivagem de L-OPA1 realizada pela OMA1 inibe a fusão e está associada com fragmentação mitocondrial (QUIRÓS; LANGER; LÓPEZ-OTÍN, 2015). Várias condições de estresse ativam a OMA1, como por exemplo estresse oxidativo, estresse térmico e despolarização da mitocôndria. Ao avaliarmos a expressão dos transcritos de OMA1 (Figura 26), verificamos que há maior expressão deste em iPSCs MELAS em relação ao Controle, confirmando a hipótese anterior de que há maior ocorrência de

mitofagia nas iPSCs do grupo MELAS. No entanto, a análise da quantidade de proteína L-OPA1 e S-OPA1, bem como de OMA1 por experimentos de Western Blot são importantes para confirmar esses resultados.

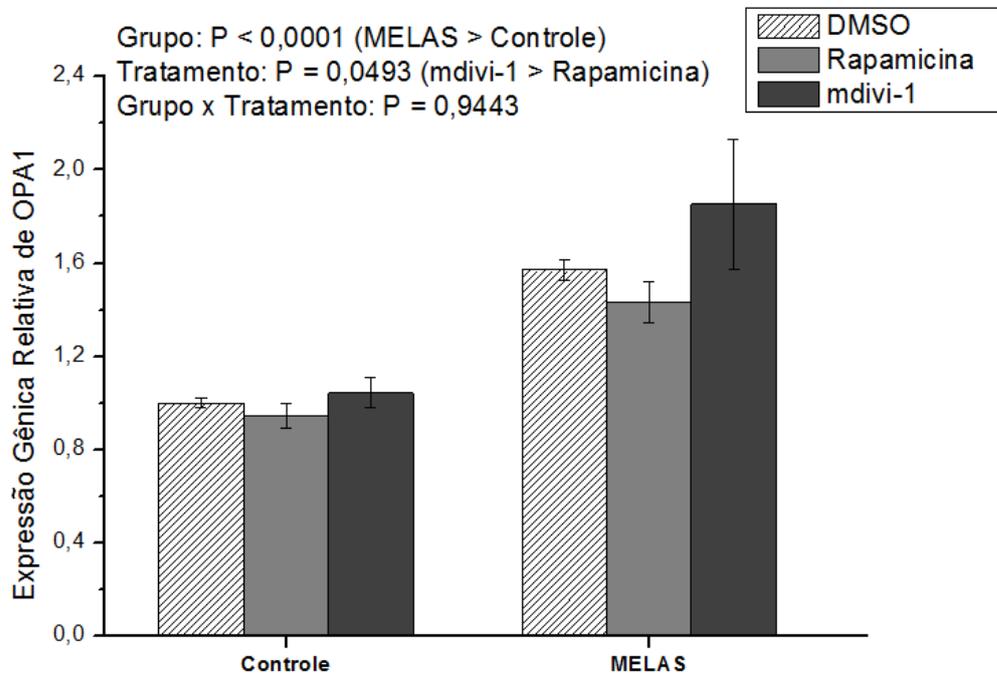


Figura 25: Expressão relativa de OPA1 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$) sendo a expressão de OPA1 maior no grupo MELAS. Foi observado efeito de tratamento ($P = 0,0493$), sendo mdivi-1 maior que Rapamicina.

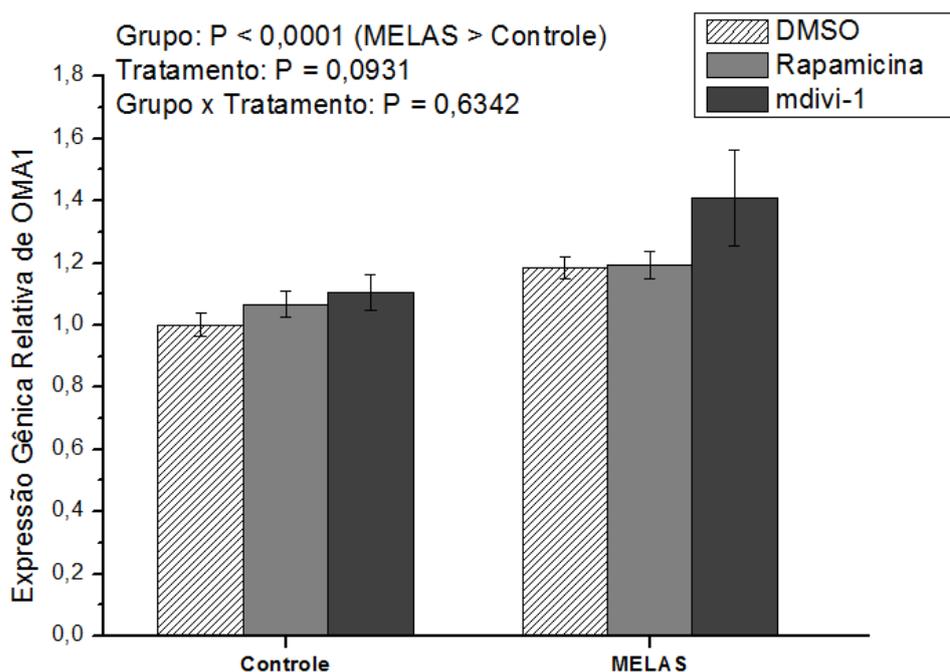


Figura 26: Expressão relativa de OMA1 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0001$) sendo a expressão de OMA1 maior no grupo MELAS.

Com o intuito de confirmar os resultados encontrados acima, analisamos a expressão de transcritos de FBXO7 (Figura 27), outro componente da via da mitofagia (NELSON; RANDLE; LAMAN, 2013). A FBXO7 interage diretamente com PARKIN, através do seu domínio Ubl, ajudando a recrutá-lo para a mitocôndria para iniciar o processo de mitofagia (NELSON; RANDLE; LAMAN, 2013). Verificamos que há maior expressão de FBXO7 em iPSCs MELAS (Figura 27), evidenciando o estresse causado pela elevada quantidade de mutações no mtDNA. Em concordância com esse resultado, um trabalho recente de Zhou Z. et al. (2015) mostrou que a FBXO7 além de ser vital para a mitofagia, tem sua expressão aumentada em condições de estresse (ZHOU et al., 2015).

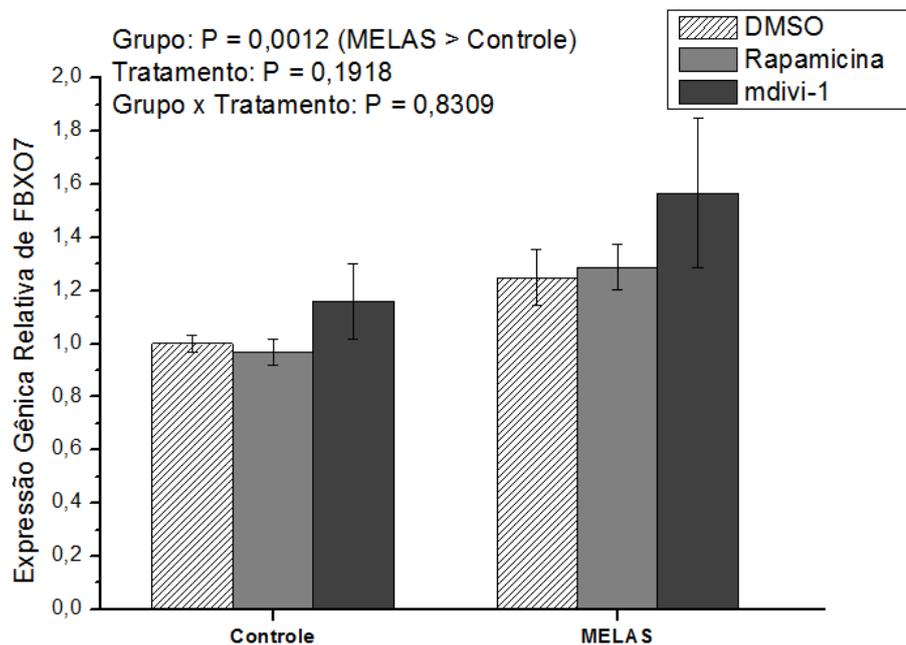


Figura 27: Expressão relativa de FBXO7 em iPSCs Controle e MELAS. As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tratamento. Foi observado efeito de grupo ($P < 0,0012$) sendo a expressão de FBXO7 maior no grupo MELAS.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, propomos a utilização de iPSCs derivadas de pacientes com doenças mitocondriais como modelo de estudo para investigar a eliminação de moléculas de mtDNA com mutações patogênicas.

Verificamos que a derivação das linhagens de fibroblastos portadoras de KSS resultou em iPSCs com níveis quase indetectáveis de mtDNA mutante ($< 0,1\%$) o que impossibilitou testar a hipótese principal deste trabalho. Já a derivação de iPSCs a partir de fibroblastos portadores de MELAS gerou iPSCs com alta taxa da mutação ($> 98\%$) e essas apresentaram diminuição da heteroplasmia ao longo do cultivo. Apesar do tratamento com Rapamicina não resultar em diminuição da heteroplasmia durante a reprogramação, verificamos que há fortes indícios da existência de mecanismos autofágicos direcionados a mitocôndria em iPSCs MELAS.

Portanto de acordo com a hipótese inicial, a reprogramação celular nas iPSCs MELAS resultou em alterações mitocondriais que levaram a seleção negativa de moléculas de mtDNA com mutações patogênicas, com fortes evidências da existência de mecanismos autofágicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AL RAWI, S. et al. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6059, p. 1144–7, nov. 2011.
- ALBERTS, B. et al. Molecular biology of the cell. In: **Molecular biology of the cell**. [s.l.: s.n.]. p. 1396.
- BAI, R.-K.; WONG, L.-J. C. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. **Clinical chemistry**, v. 50, n. 6, p. 996–1001, jun. 2004.
- BAI, R.-K.; WONG, L.-J. C. Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 7, n. 5, p. 613–22, nov. 2005.
- BATTERSBY, B. J.; LOREDO-OSTI, J. C.; SHOUBRIDGE, E. A. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. **Nature genetics**, v. 33, n. 2, p. 183–186, 2003.
- BUKOWIECKI, R.; ADJAYE, J.; PRIGIONE, A. Mitochondrial Function in Pluripotent Stem Cells and Cellular Reprogramming. **Gerontology**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2014.
- CAO, L. et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. **Online**, v. 39, n. 3, p. 386–390, 2007.
- CHEN, H.; CHAN, D. C. Physiological functions of mitochondrial fusion. **New York**, v. 1201, p. 21–25, 2010.
- CHEN, H.; CHOMYN, A.; CHAN, D. C. Disruption of Fusion Results in Mitochondrial. **Biochemistry**, v. 280, n. 28, p. 26185–26192, 2005.
- CHEN, T. et al. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. **Ageing cell**, v. 10, n. 5, p. 908–11, out. 2011.
- CHERRY, A. B. C. et al. Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial dna deletion. **Stem Cells**, v. 31, p. 1287–1297, 2013a.
- CHERRY, A. B. C. et al. Induced Pluripotent Stem Cells with a Pathological Mitochondrial DNA Deletion. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, fev. 2013b.
- CHIARATTI, M. R. et al. Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 820–8, set. 2011.
- CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V. Increase in mitochondrial DNA quantity and impairment of oxidative phosphorylation in bovine fibroblast cells treated with ethidium bromide for 15 passages in culture. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 5, n. 1, p. 55–62, 2006.

- CIPOLAT, S. et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 45, p. 15927–15932, 2004.
- CREE, L. M. et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 249–54, fev. 2008.
- CREE, L. M.; SAMUELS, D. C.; CHINNERY, P. F. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 12, p. 1097–102, dez. 2009.
- DAI, Y. et al. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 3, p. 637–647, 2014.
- ELMORE, S. P. et al. Discrimination of depolarized from polarized mitochondria by confocal fluorescence resonance energy transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, p. 145–152, 2004.
- FAN, W. et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 2008, p. 958–962, 2008.
- FERREIRA, C. R. et al. Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 3, p. 563–71, mar. 2010.
- FOLMES, C. D. L. et al. Disease-causing Mitochondrial Heteroplasmy Segregated within Induced Pluripotent Stem Cell Clones Derived from A MELAS Patient. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, n. 507, abr. 2013.
- FREYER, C. et al. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. **Nature Genetics**, v. 44, n. 11, p. 1282–1285, 2012.
- FUJIKURA, J. et al. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. **Cultures**, p. 1689–1698, 2012a.
- FUJIKURA, J. et al. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1689–98, jun. 2012b.
- GILKERSON, R. W. et al. Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 5, p. 978–990, 2012.
- GORMAN, G. S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. **Annals of Neurology**, v. 77, n. 5, p. 753–759, 2015.
- HÄMÄLÄINEN, R. R. H. et al. Tissue-and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A> G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived

disease model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. E3622–30, 2013.

HAUSWIRTH, W. W.; LAIPIS, P. J. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 15, p. 4686–90, ago. 1982.

HUSSEIN, S. M. et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 58–62, 2011.

JENUTH, J. P. et al. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 14, n. 2, p. 146–151, 1996.

KENNEDY, S. et al. Transmission of Mitochondrial DNA Diseases and Ways to Prevent Them. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, 2010.

KHRAPKO, K. Two ways to make an mtDNA bottleneck. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 134–5, fev. 2008.

KODAIRA, M. et al. Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 219–225, 2015.

KOEHLER, C. M. et al. Replacement of Bovine Mitochondrial DNA by a Sequence Variant Within One Generation. v. 255, 1991.

LAURA C GRAVES, AMY K REEVE, ROBERT TAYLOR, D. M. T. Mitochondrial DNA and disease. **Annals of medicine**, v. 37, n. 3, p. 222–32, 2012.

LAZAROU, M. et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. **Nature**, p. Accepted, 2015.

LIGHTOWLERS, R. N.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? **Science (New York, N.Y.)**, v. 349, n. 6255, p. 1494–9, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

MACHADO, T. S. Transferência de citoplasma submetido ao estresse oxidativo como modelo para o estudo da herança de doenças mitocondriais. 2014. 90f. Dissertação (Mestrado) FMVZ Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

MARIE, S K N. Estudo do envolvimento do sistema nervoso central em relação ao diagnóstico molecular de mitocondriopatias 2001. 161 f. Tese (Livre-docente) –

Departamento de Neurologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001

MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. **Genetics**, v. 145, n. 2, p. 445–51, fev. 1997.

MENENDEZ, J. A. et al. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 21, p. 3658–77, nov. 2011.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 10, p. 634–646, 2014.

MONNOT, S. et al. Mutation dependence of the mitochondrial DNA copy number in the first stages of human embryogenesis. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 9, p. 1867–1872, 2013.

NELSON, D. E.; RANDLE, S. J.; LAMAN, H. Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. **Open biology**, v. 3, n. 10, p. 130131, 2013.

NEWTON, C. R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic acids research**, v. 17, n. 7, p. 2503–16, abr. 1989.

OLICHON, A. Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7743–7746, 2003.

PRIGIONE, A. et al. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 4, p. 721–33, abr. 2010.

QUIRÓS, P. M.; LANGER, T.; LÓPEZ-OTÍN, C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 345–359, 2015.

RAHMAN, S. et al. Report Decrease of 3243 ArG mtDNA Mutation from Blood in MELAS Syndrome: A Longitudinal Study. **American Journal of Human Genetics**, The, p. 238–240, 2001.

RAJASIMHA, H.; CHINNERY, P.; SAMUELS, D. Selection against pathogenic mtDNA mutations in a stem cell population leads to the loss of the 3243A→G mutation in blood. **The American Journal of ...**, n. February, p. 333–343, 2008.

RODOLFA, K. T.; EGGAN, K. A Transcriptional Logic for nuclear Reprogramming. p. 652–655, 2006.

SATO, A. et al. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. **Genetics**, v. 177, n. December, p. 2031–2037, 2007.

SCHON, E. A.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: roles of

inherited and somatic mutations. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. December, p. 878–90, 2012.

SERIN, A. et al. Mitochondrial-Associated Cell Death Mechanisms Are Reset to an Embryonic-Like State in Aged Donor-Derived iPS Cells Harboring Chromosomal Aberrations. **Pharmacology**, v. 6, n. 11, 2011.

SHITARA, H. et al. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. **Genetics**, v. 156, n. 3, p. 1277–84, nov. 2000.

SOMMER, C. A et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem cells**, v. 27, p. 543–549, 2009.

SOMMER, C. A et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 1, p. 64–74, jan. 2010.

ST. JOHN, J. The control of mtDNA replication during differentiation and development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 4, p. 1345–1354, 2014.

STEFKOVÁ, K.; PROCHÁZKOVÁ, J.; PACHERNÍK, J. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. v. 2015, n. 2006, 2015.

STEWART, J. B. et al. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, p. 657–62, 2008a.

STEWART, J. B. et al. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. **PLoS biology**, v. 6, n. 1, p. e10, jan. 2008b.

STEWART, J. B. et al. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 9, p. 657–62, set. 2008c.

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. 530–42, 2015.

SUEN, D.-F. et al. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic hybrid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11835–11840, 2010.

SUHR, S. T. et al. Mitochondrial Rejuvenation After Induced Pluripotency. **Aging**, v. 5, n. 11, 2010.

SUTOVSKY, P. et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 371–2, nov. 1999.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse

- Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 2, p. 663–676, 2006a.
- TSUKAMOTO, S. et al. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 2008, p. 117–120, 2008.
- TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO journal**, v. 27, n. 2, p. 433–46, jan. 2008.
- TWIG, G.; SHIRIHAI, O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 10, p. 1939–1951, 2011.
- VAZQUEZ-MARTIN, A. et al. Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: new insight into the role of mitophagy in cell stemness. **Aging**, v. 4, n. 6, p. 393–401, jun. 2012.
- WAI, T.; TEOLI, D.; SHOUBRIDGE, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. **Nature genetics**, v. 40, n. 12, p. 1484–8, dez. 2008.
- WONG, L.-J. C. et al. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 100, n. 2, p. 111–117, 2010.
- YOKOTA, M. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction caused by a heteroplasmic mitochondrial DNA mutation blocks cellular reprogramming. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 16, p. 4698–4709, 2015.
- ZHOU, Z. D. et al. F-box protein 7 mutations promote protein aggregation in mitochondria and inhibit mitophagy. **Human molecular genetics**, v. 24, n. 22, p. 6314–30, 2015.