

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Pedro Augusto Chikoski Albrecht

ASPECTOS TECNOLÓGICOS PARA O APRIMORAMENTO DA MITOTERAPIA

Porto Alegre

2022

Pedro Augusto Chikoski Albrecht

ASPECTOS TECNOLÓGICOS PARA O APRIMORAMENTO DA MITOTERAPIA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Co-Orientadora: Dra. Daiani Machado de Vargas

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Albrecht, Pedro Augusto Chikoski
Aspectos Tecnológicos para o Aprimoramento da
Mitoterapia / Pedro Augusto Chikoski Albrecht. --
2022.
62 f.
Orientador: Fábio Klamt.

Coorientadora: Daiani M. Vargas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Mitoterapia. 2. Neurodegeneração. 3. Aspectos
tecnológicos. I. Klamt, Fábio, orient. II. Vargas,
Daiani M., coorient. III. Título.

Pedro Augusto Chikoski Albrecht

ASPECTOS TECNOLÓGICOS PARA O APRIMORAMENTO DA MITOTERAPIA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 19 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Galina - UFRJ

Prof. Dr. Marcos Roberto de Oliveira - UFRGS

Prof. Dr. Fábio Klamt - UFRGS (orientador)

Dra. Daiani M. Vargas - UFRGS (coorientadora)

RESUMO

A mitoterapia é uma técnica recente que busca, através da administração de mitocôndrias funcionais isoladas, reverter disfunções celulares em uma variedade de condições patológicas - como isquemias pulmonar, cardíaca e cerebral, doença de Parkinson, esquizofrenia e declínio cognitivo. Em modelos celulares, animais e humanos, essa estratégia já demonstrou potencial de recuperação do perfil metabólico, reversão do estresse celular e de danos teciduais. No entanto, diversos são os parâmetros que ainda limitam a sua aplicabilidade. Em virtude da diversidade dos modelos celulares utilizados e métodos empregados - como por exemplo, o protocolo de isolamento mitocondrial - a estratégia terapêutica carece de técnicas padronizadas que garantam com satisfatória reprodutibilidade a obtenção de seus benefícios potenciais. O presente trabalho propõe explorar aspectos tecnológicos da mitoterapia, buscando contribuir para o seu aprimoramento e aplicabilidade. Para isso, foi estabelecido um modelo de degeneração *in vitro* utilizando cultivo de células de neuroblastoma humano Be(2)-M17, desafiadas com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Utilizamos a marcação com a sonda JC-1 para estabelecer o início da disfunção mitocondrial nas células tratadas, e como parâmetro para a administração de diferentes quantidades terapêuticas de mitocôndrias autólogas. Avaliamos diferentes protocolos de isolamento mitocondrial, buscando o estabelecimento de melhor rendimento e qualidade, utilizando de técnicas de dosagem protéica (com o método de BCA) e de Respirometria de Alta Resolução (Oxígrafo Oroboros O2k). O protocolo que promoveu o isolamento de mitocôndrias de células de neuroblastoma humano com perfil respiratório adequado demonstrou boa reprodutibilidade em termos de rendimento, porém o mesmo desempenho não pôde ser observado quando o método de isolamento foi testado com a linhagem de células-tronco mesenquimais. Foi estabelecido como tratamento de referência o transplante autólogo com diferentes doses terapêuticas de mitocôndrias de neuroblastoma humano em culturas do mesmo tipo celular, desafiadas com o modelo de degeneração com a 6-OHDA. Nenhuma das doses avaliadas apresentaram efeito regenerativo nas células tratadas. Ainda, a dose mitocondrial mais elevada (13x a concentração de mitocôndrias estimadas no poço para o tipo celular testado) potencializou o efeito do agente estressor. A avaliação da capacidade terapêutica da mitoterapia, com análise comparativa e validação dos métodos, sustenta a importância da otimização tecnológica, possibilitando com a confiabilidade necessária a aplicação da técnica na modulação da sobrevivência celular em diversas condições patológicas.

Palavras-chave: mitoterapia; degeneração; isolamento mitocondrial; variação metodológica.

ABSTRACT

Mitotherapy is a recent technique that seeks, through the administration of functional mitochondria, the regression of cellular dysfunctions in a variety of pathological conditions – such as pulmonary, cardiac and cerebral ischemia, Parkinson’s disease, schizophrenia and cognitive decline. In models *in vitro* and *in vivo*, this strategy has already demonstrated the potential for recovery of the metabolic state, reversal of cellular stress and tissue damage. However, there are several parameters that still limit its applicability. Due to the diversity of cell models and methods used - such as the mitochondrial isolation protocol - the therapeutic strategy lacks standardized techniques that guarantee, in a satisfactory and reproducible way, the achievement of its potential benefits. The present work proposes to explore technological aspects of mitotherapy, to contribute to its improvement and applicability. For this, it was established a model of degeneration *in vitro* using the neuroblastoma human line cell Be(2)-M17 human neuroblastoma cells, challenged with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). It was used JC-1 probe to establish the onset of mitochondrial dysfunction in cells incubated with 6-OHDA, and as a parameter for the beginning of the treatment with autologous mitochondria. It was evaluated different mitochondrial isolation protocols, to establish better yield and quality, using protein dosage techniques (with the BCA method) and High Resolution Respirometry (Oroboros O2k Oxygraph). The protocol that promoted the isolation of mitochondria from human neuroblastoma cells with adequate respiratory performance demonstrated good reproductibility in terms of yield, but the same performance could not be observed When the isolation method was tested with the mesenchymal stem cell line. As a reference treatment, it was established the autologous transplantation with different therapeutic doses of human neuroblastoma mitochondria in cultures of the same cell type, challenged with the 6-OHDA degeneration model. None of the doses evaluated showed a regenerative effect on the treated cells. Furthermore, the highest mitochondrial dose (13x the estimated mitochondria concentration in the well for the cell type tested) potentiated the effect of the stressor. The evaluation of mitotherapy’s therapeutic capacity, with comparative analysis and validation of the methods, supports the importance of technological optimization, allowing the application of the technique with reliability in the modulation of cell survival in different pathological conditions.

Keywords: mitotherapy; degeneration; mitochondrial isolation protocol; methodological variation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	7
1.1	MITOCÔNDRIAS.....	7
1.1.1	Disfunções mitocondriais.....	7
1.2	MITOTERAPIA.....	8
1.2.1	Potenciais riscos.....	10
1.2.2	Variações experimentais.....	11
1.2.2.1	Tipos celulares utilizados (transplante autólogo, alogênico ou xenogênico).....	11
1.2.2.2	Taxa de internalização de mitocôndrias.....	12
1.2.2.3	Protocolos de isolamento mitocondrial.....	13
1.2.2.4	Estratégias para avaliação da funcionalidade e potencial terapêutico de mitocôndrias isoladas.....	14
1.3	JUSTIFICATIVA.....	15
1.4	OBJETIVO GERAL.....	15
1.4.1	Objetivos específicos.....	15
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA X.....	50

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

O presente trabalho estuda a estratégia terapêutica conhecida como mitoterapia, e buscou avaliar as propriedades e possibilidades de aprimoramento da técnica em um modelo *in vitro* de neurodegeneração em neuroblastoma humano. Aspectos fundamentais para o entendimento do projeto são apresentados e discutidos abaixo.

1.1 MITOCÔNDRIAS

Mitocôndrias são organelas de origem proteobacteriana essenciais para a vida (SCHWARTZ; DAYHOFF, 1978). Sua citoarquitetura básica - matriz mitocondrial, membrana mitocondrial interna, espaço intermembrana e membrana mitocondrial externa - e maquinaria complexa são formadas e coordenadas pela interação do DNA nuclear e DNA mitocondrial (mtDNA) (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014). Dentre os papéis mais proeminentes desempenhados por mitocôndrias estão a obtenção de energia química pela oxidação de intermediários metabólicos (KAPPLER *et al.*, 2019), a síntese de fosfolípidos e grupamento heme (DAUM, 1985), tamponamento de cálcio (JOUAVILLE *et al.*, 1999) e a indução da morte celular programada, ou apoptose (LI; DEWSON, 2015). Considerando sua associação com as demandas metabólicas e de sinalização na célula, a quantidade de mitocôndrias e sua funcionalidade são fundamentais para a manutenção da vida.

1.1.1 Disfunções mitocondriais

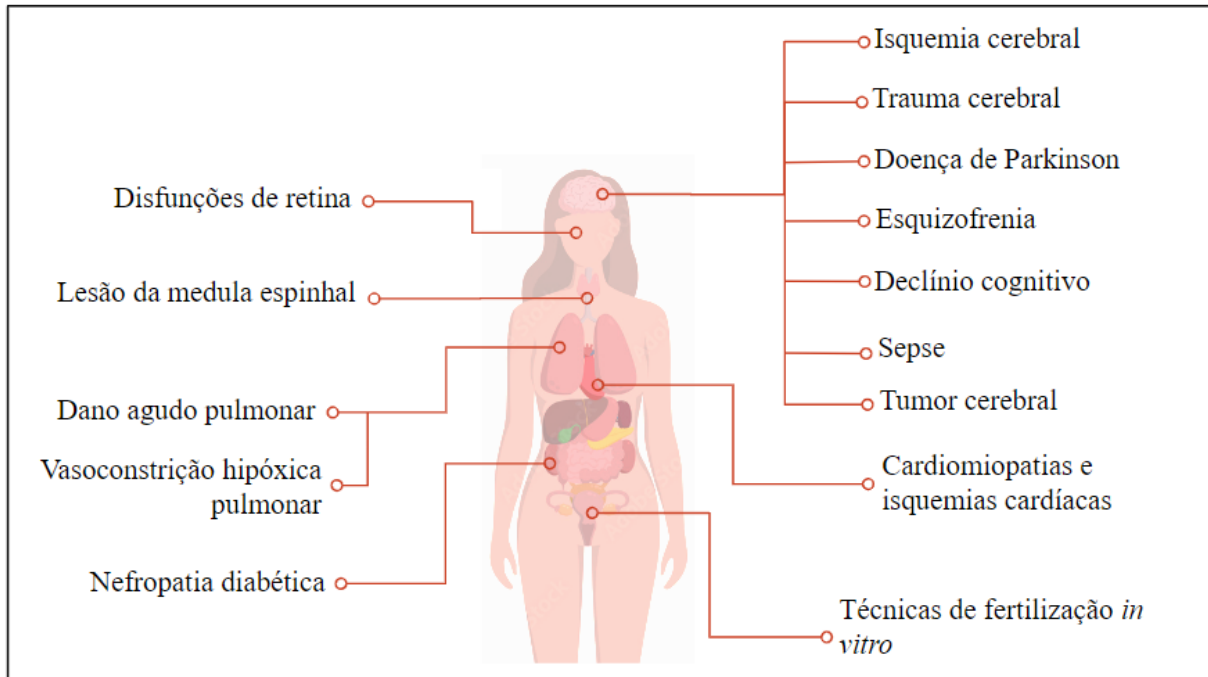
Diversas são as condições patológicas que apresentam como característica principal ou secundária a disfunção mitocondrial (GORMAN *et al.*, 2016). Defeitos nessas organelas são associados, por exemplo, com deficiências imunológicas (GARONE; TADESSE; HIRANO, 2011), hepáticas (HELBLING *et al.*, 2013), cardiomiopatias (SEBASTIANI *et al.*, 2007), declínio cognitivo (KUJOTH *et al.*, 2005) e sintomas psiquiátricos (CATALDO *et al.*, 2010). De forma geral, em condições patológicas, mitocôndrias costumam apresentar morfologia anormal (CATALDO *et al.*, 2010), defeitos na bioenergética (TREVINO *et al.*, 2019), nas dinâmicas mitocondriais (WANG *et al.*, 2009) e acúmulo de mutações no mtDNA (STENTON; PROKISCH, 2020).

1.2 MITOTERAPIA

A mitoterapia é uma técnica caracterizada pelo uso de mitocôndrias funcionais isoladas, com subsequente administração das mesmas em pacientes. A internalização dessas organelas por células de mamíferos foi identificada, pela primeira vez, em 1982, por Clark e Shay (CLARK; SHAY, 1982). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a transferência de mitocôndrias entre células é um evento fisiológico mediado por junções celulares (ISLAM *et al.*, 2012), fusão celular, formação de nanotubos de membrana (WANG; GERDES, 2015) e internalização do meio extracelular (CHENG *et al.*, 2020), e sugerem benefícios protetores e anti-inflamatórios associados.

No entanto, foi apenas no início do século XXI que as possibilidades da mitoterapia realmente despertaram o interesse científico. Em um trabalho fundamental para isso, Katrangi *et al.*, em 2007, reportou a internalização de mitocôndrias de roedor por linhagens de células cancerígenas, resultando em recuperação das taxas respiratórias células com mtDNA depletado (KATRANGI *et al.*, 2007). A partir disso, foi observada progressiva expansão dos estudos e da diversificação de condições patológicas potencialmente tratadas por essa terapia. Dentre as disfunções para as quais a mitoterapia foi investigada estão o dano agudo pulmonar (ZHOU *et al.*, 2016; MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020), as cardiomiopatias e isquemias cardíacas (MASUZAWA *et al.*, 2013; COWAN *et al.*, 2016; EMANI *et al.*, 2017; BLITZER *et al.*, 2020), a nefropatia diabética (KONARI *et al.*, 2019), as disfunções na retina (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; AHARONI-SIMON *et al.*, 2022) e técnicas de fertilização *in vitro* (OKTAY *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; LABARTA *et al.*, 2019). Mais especificamente na área de patologias neurais a mitoterapia já foi usada em estudos de isquemia (HUANG *et al.*, 2016; SHI; GUO; LIU, 2021; XIE *et al.*, 2021), trauma (ZHANG *et al.*, 2020) e tumor cerebral (SUN *et al.*, 2019), sepse (YAN *et al.*, 2020), doença de Parkinson (CHANG *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2021), lesão da medula espinhal (GOLLIHUE *et al.*, 2017; GOLLIHUE *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2022), esquizofrenia (ROBICSEK *et al.*, 2018) e declínio cognitivo (MA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021).

Figura 1 - Principais condições patológicas em estudos de mitoterapia



Esquema apresentando as principais condições patológicas presentes em estudos com mitoterapia. Os estudos referenciados utilizam uma diversidade de modelos *in vitro* e *in vivo*. Fonte: elaborada pelo autor.

Dessa forma, a mitoterapia se apresenta como uma vantajosa possibilidade terapêutica para um vasto número de doenças e traumas. Porém ainda não se conhece de forma satisfatória os mecanismos pelos quais mitocôndrias saudáveis transplantadas exercem seus efeitos terapêuticos. De forma geral, a administração dessas organelas resulta na reversão do desequilíbrio metabólico, com suprimento das necessidades energéticas (PACAK *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2017; ROBICSEK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2021), recuperação da integridade celular e tecidual (MASUZAWA *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016; EMANI *et al.*, 2017; MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021), aprimoramento da morfologia mitocondrial (CHANG *et al.*, 2017), diminuição do estresse oxidativo (SHI *et al.*, 2017; KONARI *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2020), aumento da capacidade de tamponamento de cálcio (ZHOU *et al.*, 2016), alterações na sinalização celular e parácrina (ZHOU *et al.*, 2016; ROBICSEK *et al.*, 2018; KONARI *et al.*, 2019), alterações de expressão gênica (ALEXANDER *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2021), diminuição da morte celular (TAKEDA *et al.*, 2010; COWAN *et al.*, 2016; MAEDA *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2021) e redução da inflamação (YAN *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021; CHANG *et al.*, 2021). Certos estudos indicam que tais benefícios ocorrem através do suprimento direto das necessidades bioenergéticas. Para isso, é sugerido que mitocôndrias doadas escapam de vias de degradação, se fusionam com mitocôndrias hospedeiras danificadas e, assim, reparam a maquinaria

bioenergética (COWAN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021). Outros estudos, observando sua localização perinuclear, sugerem que devido a baixas taxas de internalização e de fusão com organelas hospedeiras, os benefícios atribuídos às mitocôndrias exógenas se encontram na alteração de mecanismos de sinalização e expressão gênica (KITANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016; ALEXANDER *et al.*, 2021; SHI; GUO; LIU, 2021). O mais provável é que os efeitos terapêuticos observados sejam resultado da combinação de ambos os mecanismos.

1.2.1 Potenciais riscos

Embora a mitoterapia esteja se mostrando bastante promissora, sua aplicação pode não ser livre de riscos (CHANG *et al.*, 2017). Dentre as questões mais ressaltadas está o papel já conhecido de pró-inflamação das mitocôndrias, que podem ser uma fonte de *DAMP's* (padrões moleculares associados a efeitos danosos) (PUHM *et al.*, 2019). Essas organelas atuam como mediadores do desencadeamento inflamatório quando, no meio extracelular, seus componentes são reconhecidos por receptores específicos em células do sistema imune ou outros tipos celulares (ZHU *et al.*, 2018; JOSHI *et al.*, 2019; PUHM *et al.*, 2019). Concordando com tais preocupações, certos estudos relataram resposta inflamatória (HUANG *et al.*, 2016; GOLLIHUE *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2021). A microinjeção de mitocôndrias na medula espinhal danificada de ratos provocou aumento da ativação de macrófagos no local da injeção, até 7 dias após a terapia. Somado a isso, macrófagos e pericitos foram os tipos celulares da medula espinhal danificada que demonstraram maior propensão de co-localização com mitocôndrias exógenas (GOLLIHUE *et al.*, 2018). Ainda, a injeção de mitocôndrias de outras espécies modelo de isquemia em ratos causou resposta imune inata, atraindo macrófagos e micróglia para o local (HUANG *et al.*, 2016). Também, a infusão intranasal de mitocôndrias em ratos modelos para parkinsonismo causou forte resposta inflamatória (com liberação de IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-17A) (CHANG *et al.*, 2021).

Em contrapartida, outros artigos não identificaram aumento da resposta inflamatória após a adição de mitocôndrias purificadas (MASUZAWA *et al.*, 2013; RAMIREZ-BARBIERI *et al.*, 2019), considerando-a inclusive como uma possível terapia anti-inflamatória (MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2022). O transplante de mitocôndrias de músculo de ratos para o pulmão ou espinha dorsal danificada de animais da mesma espécie reduziu respectivamente a infiltração inflamatória (MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020) e marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-6 e NO (LIN *et al.*, 2022). Outro importante

exemplo é o estudo clínico mitoterápico em que pacientes pediátricos com disfunções cardíacas receberam injeção de mitocôndrias autólogas purificadas diretamente em seus corações. Esse estudo não reportou efeitos adversos imediatos nem alterações nos marcadores inflamatórios locais ou sistêmicos (EMANI *et al.*, 2017).

1.2.2 Variações experimentais

Em virtude de seu caráter incipiente, a mitoterapia apresenta enorme diversidade quanto aos métodos de isolamento, as fontes doadoras e receptoras de mitocôndrias, as doses terapêuticas e ferramentas de avaliação terapêutica. Em decorrência das diferentes escolhas de técnicas e objetos de estudo, os trabalhos até então publicados formam uma rede heterogênea de informações a respeito dessa abordagem terapêutica.

1.2.2.1 Tipos celulares utilizados (transplante autólogo, alogênico ou xenogênico)

Inúmeros são os tecidos e tipos celulares que já foram usados para o isolamento de mitocôndrias. *In vitro*, mitocôndrias foram isoladas de linfócitos derivados de paciente (ROBICSEK *et al.*, 2018) e linhagens celulares humanas de fibroblasto pulmonar (MACHEINER *et al.*, 2016), osteosarcoma (CHANG *et al.*, 2017), adenocarcinoma de células epiteliais (MASUZAWA *et al.*, 2013; PACAK *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018), rim embrionário (PATEL *et al.*, 2017), astrócitos (SUN *et al.*, 2019), carcinoma hepatocelular (SHI *et al.*, 2017) e cardiomiócitos (MAEDA *et al.*, 2020). Outro importante tipo doador de mitocôndrias são células-tronco mesenquimais (KIM *et al.*, 2018; KONARI *et al.*, 2019; MAEDA *et al.*, 2020). *In vivo*, essas organelas já foram isoladas de cérebro (ROBICSEK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), plaquetas (SHI; GUO; LIU, 2021), fígado (KATRANGI *et al.*, 2007; NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2021) e músculo esquelético (BLITZER *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2022). Os três últimos são mais considerados em decorrência de sua relativa facilitada extração, maior quantidade de obtenção de organelas e perfil de suas mitocôndrias (SHI; GUO; LIU, 2021)

Estudos mitoterápicos podem realizar tratamentos com mitocôndrias autólogas, alogênicas ou xenogênicas. Tratamentos autólogos - quando as organelas são purificadas a partir do organismo que as recebe - são considerados mais seguros, com maior especificidade

e menor risco de possível rejeição do sistema imune (SUN *et al.*, 2019; MASUZAWA *et al.*, 2013; EMANI *et al.*, 2017). Estudos utilizando mitocôndrias alogênicas - provenientes de organismos da mesma espécie - também apresentaram resultados promissores (MACHEINER *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2019; CHANG *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022). Ainda assim, a translação clínica requer validação sobre eficácia e segurança, especialmente em relação à compatibilidade entre mtDNA doador e recipiente (WANG *et al.*, 2017) e efeito inflamatório (GOLLIHUE *et al.*, 2018; MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022). Por fim, organelas de origem xenogênica - de diferentes espécies - ainda que consideradas com maior relutância, também parecem demonstrar efeitos positivos, com poucos ou nenhum dano relacionado (CHANG *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017; NASCIMENTO-DOS-SANTOS, 2020). Alguns estudos, no entanto, reportaram resposta inflamatória com proliferação de microglia e astrócitos (HUANG *et al.*, 2016), enquanto outros não observaram tais efeitos (ALEXANDER *et al.*, 2021). Um grande benefício da estratégia xenogênica para estudos mitoterópicos é a facilidade de monitoramento das organelas exógenas no organismo hospedeiro, pois podem ser usados anticorpos específicos (MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021).

1.2.2.2 Taxa de internalização de mitocôndrias

A internalização de mitocôndrias já foi observada em estudos envolvendo modelos *in vitro*, animais (COWAN *et al.*, 2016; BLITZER *et al.*, 2020) e seres humanos (EMANI *et al.*, 2017). Ainda assim, os mecanismos de internalização de mitocôndrias não estão completamente elucidados. Os principais mecanismos candidatos são a endocitose (KATRANGI *et al.*, 2007; HAYAKAWA, 2018) mediada por clatrina e dinamina (PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021) ou por actina e macropinocitose (KITANI *et al.*, 2014). É importante ressaltar que tipos celulares diferentes possuem capacidade de internalização de mitocôndrias distinta, possivelmente devido a diferentes propriedades endocíticas e expressão de maquinaria de internalização. Essa variação na taxa de internalização irá influenciar, por exemplo, no tempo necessário de incubação das mitocôndrias com as células para a obtenção do efeito terapêutico. Ainda que variável, alguns trabalhos reportaram baixas taxas de internalização de mitocôndrias exógenas, com variações de 3-15% (MASUZAWA *et al.*, 2013; KITANI *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2020; SHI; GUO; LIU, 2021), 15-30% (KITANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016; ROBICSEK *et al.*, 2018) e 50% (ROBICSEK *et al.*, 2018). Um fator que pode influenciar na

taxa de internalização é o estado das células receptoras. Alguns trabalhos indicam que o estresse celular resulta no aumento da internalização de mitocôndrias (BABENKO *et al.*, 2018; MISTRY *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019). Ainda assim, outros afirmam que não encontraram tal associação (HUANG *et al.*, 2016; ALEXANDER *et al.*, 2021; SHI; GUO; LIU, 2021).

1.2.2.3 Protocolos de isolamento mitocondrial

O processo de isolamento de mitocôndrias é uma etapa fundamental para a capacidade terapêutica da mitoterapia. Ainda que seus fundamentos se mantenham na maioria dos protocolos utilizados, grande é a variação de certos aspectos - influenciada, por exemplo, pelo tipo celular doador de mitocôndrias. Preferencialmente, todo o processo de isolamento deve ser feito em temperatura de 4°C, contribuindo para a preservação da viabilidade e função mitocondrial (GOLLIHUE *et al.*, 2017; PAMENTER; LAU; RICHARDS, 2018). De forma geral, para células em cultura, o isolamento de mitocôndrias inicia com o destacamento das células - com tripsina (COWAN *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017; KONARI *et al.*, 2019) ou raspadores mecânicos (GOLLIHUE *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Foi observado que apesar da tripsina garantir maior rendimento, foram encontradas atividades residuais no *pellet* mitocondrial, podendo assim causar danos (GOLLIHUE *et al.*, 2017). Para isolamentos de tecidos, após ser realizada a coleta, o mesmo é cortado em pedaços menores para aumentar a área de exposição à tripsina ou tampão de lise (GOLLIHUE *et al.*, 2018; NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2021). Após o destacamento ocorrem centrifugações, com variação na velocidade para obter purificações seriadas, intercaladas pela lise celular mecânica (YI *et al.*, 2007; GOLLIHUE *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2021) ou química (SUN *et al.*, 2019). A lise mecânica utiliza de homogeneizadores automáticos (COWAN *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2021) ou manuais, que costuma promover a lise celular com 15 a 30 *strokes* (KATRANGI *et al.*, 2007; KITANI *et al.*, 2014; MAEDA *et al.*, 2020). Alguns estudos incubam as células em tampão hipotônico para promover o extravasamento celular com a diminuição da osmolaridade. Depois da lise, a osmolaridade da solução é balanceada adicionando tampão hipertônico (PATEL *et al.*, 2017; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021). Para aumentar a purificação, alguns artigos fazem bombeamento de nitrogênio (GOLLIHUE *et al.*, 2017), filtram o isolado (COWAN *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2020; AHARONI-SIMON *et al.*, 2022), utilizam técnicas de gradiente de Ficoll (GOLLIHUE *et al.*, 2017; GOLLIHUE *et al.*, 2018) ou Percoll (ROBICSEK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), ou associam as organelas com

microbeads para subsequente separação magnética (MACHEINER *et al.*, 2016).

Após o processo de isolamento, as organelas podem ser mantidas em gelo por até 3-4 horas (PATEL *et al.*, 2017; BLITZER *et al.*, 2020; AHARONI-SIMON *et al.*, 2022). A análise do isolado costuma identificar organelas com potencial de membrana estável e morfologias saudáveis - indicando funcionalidade (COWAN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016). É importante levar em consideração não só a quantidade de mitocôndrias obtidas com o isolamento, mas também a sua qualidade determinada pela avaliação da sua taxa respiratória (GOLLIHUE *et al.*, 2017).

1.2.2.4 Estratégias para avaliação da funcionalidade e potencial terapêutico de mitocôndrias isoladas

Diversas são as técnicas empregadas para avaliação da capacidade respiratória, integridade, potencial de membrana e capacidade terapêutica de mitocôndrias isoladas. No entanto, as variações desses protocolos e ferramentas podem impactar nos resultados e em sua interpretação. Estudos de mitoterapia costumam avaliar, por exemplo, a quantidade de mitocôndrias obtidas com o isolamento (HUANG *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017), a internalização de mitocôndrias exógenas e sua qualidade, por microscopia confocal (ZHOU *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2017; ROBICSEK *et al.*, 2018), imunohistoquímica (ZHOU *et al.*, 2016; GOLLIHUE *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2021) ou microscopia eletrônica de transmissão (KITANI *et al.*, 2014) que permite a visualização da morfologia, incluindo o estado de cristais e membranas mitocondriais (CHANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

Para a análise da funcionalidade das mitocôndrias isoladas ou das mitocôndrias presentes nas células receptoras, podem ser mensurados: produção de ATP (PACAK *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2017; KIM, 2018), ROS (SHI *et al.*, 2017; KONARI *et al.*, 2019; SHI; GUO; LIU, 2021), capacidade de tamponamento de cálcio (ZHOU *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017) ou taxa de consumo de oxigênio (com equipamentos como *Seahorse*TM (SUN *et al.*, 2019), *Oroboros*TM (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021) ou *Clark Oxygen Electrode* (ROBICSEK *et al.*, 2018)).

A marcação mitocondrial é um aspecto essencial para os estudos mitoterápicos, possibilitando a visualização e acompanhamento da internalização (GOLLIHUE *et al.*, 2018). Os marcadores mitocondriais podem ser divididos entre dependentes ou independentes de voltagem (XIE *et al.*, 2021). Um importante marcador dependente de voltagem é o JC-1 (iodeto

de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (SHI *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020), que pode indicar o potencial de membrana de mitocôndrias isoladas (ROBICSEK *et al.*, 2018; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2021) ou em células receptoras (YAN *et al.*, 2020; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021). Ainda, podem ser utilizados marcadores transgênicos (GOLLIHUE *et al.*, 2017; KONARI *et al.*, 2019; MAEDA *et al.*, 2020), fluorescentes (HUANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2019; AHARONI-SIMON *et al.*, 2022) ou de análogos de nucleotídeos tipo bromodesoxiuridina (BrdU) (HUANG *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2021). Uma estratégia muito usada, por exemplo, é a aplicação concomitante de mais de um marcador – um para organelas hospedeiras e outro para transplantadas (HUANG *et al.*, 2016; KIM, 2018; SHI; GUO; LIU, 2021).

1.3 JUSTIFICATIVA

A mitoterapia é uma vantajosa possibilidade terapêutica para diversas condições patológicas. Ainda assim, em decorrência da variação dos métodos empregados, a administração terapêutica de mitocôndrias apresenta limitações quanto a sua aplicabilidade. Para assegurar maior confiança e reprodutibilidade à estratégia de reversão dos danos celulares e teciduais, são necessários estudos de padronização e otimização das técnicas. A avaliação de aspectos metodológicos da administração terapêutica de mitocôndrias irá potencializar o aprimoramento da mesma em inúmeras patologias.

1.4 OBJETIVO GERAL

O trabalho propõe explorar aspectos metodológicos para o aprimoramento da tecnologia de administração terapêutica de mitocôndrias, avaliando diferentes parâmetros associados com a estratégia de recuperação terapêutica, em situação de disfunção mitocondrial.

1.4.1 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) Estabelecer o modelo de degeneração *in vitro* com células de neuroblastoma humano Be(2)-M17 desafiadas com 6-hidroxidopamina (6-OHDA);
- b) Avaliar o potencial terapêutico (redução da degeneração) da administração de diferentes concentrações (doses terapêuticas) de mitocôndrias autólogas funcionais em células Be(2)-M17 desafiadas com 6-OHDA (padrão de referência);
- c) Avaliar diferentes protocolos de isolamento de mitocôndrias, utilizando células de neuroblastoma humano como referência, através do rendimento de proteínas mitocondriais e da análise da qualidade do isolado - com técnicas de oximetria de alta resolução;
- d) Após a escolha de um protocolo de isolamento com obtenção mitocondrial satisfatória, testá-lo utilizando diferentes tipos celulares como células doadoras de mitocôndrias, em relação ao tipo celular de referência.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Aspectos Tecnológicos para o Aprimoramento da Mitoterapia

Pedro Augusto Chikoski Albrecht*, Camila Kehl Dias, Daiani Machado de Vargas, Fábio Klamt

Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

*Autor correspondente:

Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, Porto Alegre (RS) Brasil, 90035-003. Fone: +55 51 3308-5556; FAX: +55 51 3308-5535. E-mail: pedroalbrecht99@gmail.com

Resumo

A mitoterapia é uma técnica recente que busca reverter os danos mitocondriais através da administração de mitocôndrias íntegras. Ainda que já testada em diversas condições patológicas, diversos são os parâmetros que limitam a aplicabilidade da técnica. Dessa forma, o presente trabalho irá explorar os aspectos tecnológicos para o aprimoramento da mitoterapia. Para isso, foi estabelecido um modelo *in vitro* de degeneração, com cultivo de células de neuroblastoma humano Be(2)-M17 desafiadas com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), e foram avaliados protocolos de isolamento mitocondrial. Nesse cenário, o tratamento com mitocôndrias íntegras autólogas demonstrou apenas efeito danoso em decorrência da superdosagem de mitocôndrias.

Palavras-chave: Mitoterapia, Neurodegeneração, Isolamento mitocondrial, Variações metodológicas.

1. Introdução

A mitoterapia é uma técnica recente caracterizada pelo uso terapêutico de mitocôndrias funcionais isoladas, com subsequente administração das mesmas em pacientes. Dentre as condições patológicas potencialmente tratadas por essa terapia estão: dano agudo pulmonar (Zhu et al. 2016; Moskowitsova et al. 2020), cardiomiopatias e isquemias cardíacas (Masuzawa

et al. 2013; Cowan et al. 2016; Emani et al. 2017), doença de Parkinson (Chang et al. 2016; Shi et al. 2017), lesão da medula espinhal (Gollihue et al. 2017; Lin et al. 2022) e declínio cognitivo (Ma et al. 2020; Alexander et al. 2021).

Ainda não se conhece de forma satisfatória os mecanismos pelo qual o tratamento com mitocôndrias saudáveis exerce seus efeitos terapêuticos. De forma geral, a administração dessas organelas resulta na reversão do desequilíbrio metabólico, com suprimento das necessidades energéticas (Pacak et al. 2015; Wu et al. 2018) e recuperação da integridade celular e do tecido (Masuzawa et al. 2013; Emani et al. 2017; Moskowitsova et al. 2020), diminuição do estresse oxidativo (Konari et al. 2019; Chang et al. 2021), alterações na expressão gênica e sinalização celular (Konari et al. 2019; Alexander et al. 2021; Xie et al. 2021), diminuição da morte celular (Shi et al. 2017; Chang et al. 2021), e redução da inflamação (Yan et al. 2020; Lin et al. 2022).

Embora a mitoterapia esteja se mostrando bastante promissora, sua implementação pode não ser livre de riscos (Chang et al. 2017), e apresenta limitações como a baixa internalização das organelas exógenas (Zhou et al. 2016; Wu et al. 2018), e o seu potencial efeito pró-inflamatório (Huang et al. 2016; Gollihue et al. 2017). Em virtude de seu caráter incipiente, e da diversidade de métodos empregados, o transplante de mitocôndria carece de parâmetros otimizados, que promovam com a robustez necessária uma técnica confiável e reprodutível de reversão dos prejuízos celulares testados. Aspectos como o protocolo de isolamento mitocondrial, os modelos celulares doadores e receptores das organelas e as técnicas de avaliação do potencial terapêutico, impactam de forma significativa nos resultados.

Assim, mais estudos são necessários para garantir a padronização e análise comparativa dos métodos, para assegurar melhor eficiência e confiabilidade à técnica. Dessa forma, o presente trabalho irá explorar os aspectos metodológicos para o aprimoramento da administração terapêutica de mitocôndrias, avaliando parâmetros associados com a estratégia de recuperação terapêutica, em situação de disfunção mitocondrial. Para isso, será estabelecido o tratamento autólogo de mitocôndrias íntegras de células de neuroblastoma humano Be(2)-M17 em células, de mesma linhagem, em cenário degenerativo - desafiadas com o agente estressor 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

2. Materiais e métodos

2.1 Cultura celular

Em todas as etapas do trabalho, a não ser quando mencionado, foi utilizada a linhagem celular de neuroblastoma humano Be(2)-M17. A cultura dessas células foi mantida em garrafas com área de 75 cm², em meio *high glucose* DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para avaliar a reprodutibilidade do protocolo de isolamento mitocondrial desenvolvido no presente projeto em diferentes linhagens celulares, foi utilizada a linhagem de células-tronco mesenquimais, gentilmente cedidas pela professora Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Essa linhagem foi mantida em meio *low glucose* DMEM suplementado com 10% de SFB.

2.2 Curva de toxicidade de 6-hidroxidopamina

Para a determinação da concentração de 6-OHDA capaz de reduzir em 50 % a viabilidade da cultura celular (DL50) as células de neuroblastoma humano Be(2)-M17, em placa de 24 poços com 150.000 células por poço, foram desafiadas com diferentes concentrações de 6-OHDA (15 µM, 20 µM, 25 µM e 30 µM) diluída em 0,1 % de ácido ascórbico. Depois de 1h 30 min de incubação, o meio com o agente estressor foi trocado e, 22 h e 30 min depois, foi avaliada a viabilidade celular por ensaio de MTT.

2.3 Isolamento de mitocôndrias

Para o isolamento de mitocôndrias, dois protocolos distintos foram testados, conforme apresentado na **Fig. 1**. O primeiro protocolo, denominado “Isolamento mitocondrial com tampão de isolamento isotônico”, baseado no trabalho de Klamt (Klamt; Shacter, 2005). Basicamente, o isolamento inicia com duas repetições de lavagem e destacamento celular com *cell scrappers* em PBS 1x. Após uma centrifugação a 1.250x g, por 5 minutos, o *pellet* é ressuspenso em tampão isotônico (Manitol 220 mM, Sacarose 70 mM, HEPES 5 mM (pH: 7.4), EGTA 1 mM, BSA livre de ácidos graxos 0,5 mg/mL) e uma alíquota é retirada para a contagem de células com a câmara de Neubauer. As células são centrifugadas a 600x g por 5 minutos, e o *pellet* ressuspenso em tampão isotônico é homogeneizado, gentilmente, em *potter Elvehjem* por 5 minutos. A homogeneização mecânica é repetida mais uma vez e é realizada uma centrifugação a 600x g, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante passa por centrifugações de 10 minutos a 2.000x g e 10.000x g. Para a retirada da alíquota para a quantificação de proteínas por método de BCA (ácido bicinonínico), o *pellet* é ressuspenso em tampão MiR-05 modificado (EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, BSA livre de ácidos graxos 1g/L, taurina 20 mM, pH 7.1). Por fim, ocorre mais uma

centrifugação a 10.000x g, por 10 minutos, e o isolado mitocondrial é ressuspense em tampão.

O segundo protocolo foi desenvolvido a partir do primeiro método, com modificações baseadas no trabalho de Panov (Panov, 2013), e foi denominado “Isolamento mitocondrial com choque hipotônico”. Como apresentado na **Fig. 1B**, esse protocolo difere do primeiro em alguns pontos. Basicamente, as células, após uma lavagem com HBSS 1x, são destacadas gentilmente com *cell scrappers*. O mesmo processo é repetido e, para garantir a máxima obtenção de células, a garrafa é lavada com HBSS 1x. Após uma centrifugação de 600x g, por 5 minutos, o *pellet* é ressuspense em 10 mL de HBSS 1x. Nessa etapa, é retirada uma alíquota para a contagem de células com a câmara de Neubauer. Depois de nova centrifugação à 600x g, por 5 minutos, o *pellet* ressuspense é incubado por 10 minutos em 1 mL de tampão de isolamento hipotônico (Sacarose 100 mM, HEPES 5 mM (pH: 7.4), EGTA 1 mM). Após isso, é realizada a homogeneização mecânica, gentilmente, com 30 *strokes*. Em seguida, é adicionado às células o tampão de isolamento hipertônico (Manitol 660 mM, Sacarose 10 mM, HEPES 5 mM (pH: 7.4), EGTA 1 mM, BSA livre de ácidos graxos 1,5 mg/mL), para a garantia do equilíbrio osmolar da solução, e é realizada uma centrifugação a 2.000x g, por 5 minutos. O sobrenadante coletado é mantido em gelo e o *pellet* ressuspense em tampão de isolamento isotônico. Em seguida, o mesmo processo de homogeneização e centrifugação é repetido duas vezes. No fim dessa etapa, os sobrenadantes são centrifugados a 2.000x g, por 5 minutos e os novos sobrenadantes são juntados e centrifugados a 10.000x g, por 10 minutos. Depois, o *pellet* é ressuspense em tampão de isolamento isotônico sem BSA (Manitol 220 mM, Sacarose 70 mM, HEPES 5 mM (pH 7.4)) e centrifugado a 10.000x g, por 10 minutos. Em seguida, é coletada uma alíquota do *pellet* ressuspense, para quantificação de proteínas do material isolado pelo método de BCA. O isolado mitocondrial é mantido em gelo até a realização do teste mitoterápico. Para a oximetria de alta resolução, o isolado mitocondrial é novamente centrifugado a 10.000x g, por 10 minutos, e o *pellet* ressuspense em tampão MiR-05 modificado. Durante todo o processo, em ambos os protocolos, as células e isolado mitocondrial são mantidos na temperatura de 4°C.

FIGURA 1

2.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Para o estabelecimento de parâmetros de disfunção mitocondrial causados pelo tratamento com o neurotóxico 6-OHDA, foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de

5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), para a análise do potencial de membrana de mitocôndrias das células de neuroblastoma humano Be(2)M-17, em placa de 24 poços, como descrito por Peruzzotti-Jametti (Peruzzotti-Jametti et al. 2021). Em resumo, depois do desafio com 6-OHDA por 1h e 30min, foi realizada a troca de meio e adicionado a marcador JC-1 na concentração em 10 µg/mL. Para o controle positivo de despolarização foi utilizado carbonilcianeto-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) 10 mM. Após uma incubação a 37°C por 20 minutos, as células foram destacadas da placa com tripsina, e centrifugadas a 1.000x g, por 3 minutos. Os *pellets* ressuspensos em PBS 1x foram dispostos em placas de fundo preto. O potencial de membrana mitocondrial foi determinado pela relação da fluorescência vermelha e verde em comprimentos de onda de excitação de 470 nm e de emissão de 540 e 590 nm. A cor vermelha se acumula sob a forma de agregados-J em mitocôndrias polarizadas. Já quando a organela está despolarizada, o JC-1 permanece na forma de monômeros e emite a cor verde (Yan et al. 2020).

2.5 Oximetria de alta resolução

A análise da funcionalidade das mitocôndrias isoladas foi determinada por respirometria em oxígrafo de alta resolução (Oroboros O2k, Innsbruck, Áustria), assim como reportado em trabalhos anteriores (Chang et al. 2016; Wu et al. 2018; Nascimento-dos-Santos et al. 2020). Após a purificação, as mitocôndrias foram ressuspensas em tampão MiR-05 modificado. O perfil de respiração foi avaliado pela adição seriada, na *chamber* contendo as organelas, dos substratos mitocondriais: glutamato 2M, malato 0,8 M, ADP 0,5 M, piruvato 2M e succinato 1M. Em seguida, foi adicionado o indicador da integridade da membrana mitocondrial citocromo C 4 mM. O fator de controle do citocromo C foi calculado como a subtração por 1 do produto do estado de respiração prévio à adição do citocromo C dividido pelo estado de respiração posterior à adição do citocromo C (Gnaiger, 2014). Para a determinação da atividade dos diferentes processos envolvidos com a produção de ATP e respiração mitocondrial, foram adicionadas as drogas Oligomicina 2 µg/mL, FCCP 1 mM, Rotenona 1 mM e Antimicina 5 mM. A razão de controle respiratório (RCR) foi calculada como indicativo do acoplamento de OXPHOS. As leituras foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas mitocondrial determinado pelo teste de quantificação de proteínas BCA. Todos os experimentos para avaliar a função mitocondrial foram realizados a 37°C.

2.6 Tratamento mitoterápico in vitro

Para avaliação do potencial da terapia mitocondrial em mitigar a morte celular induzida pelo toxicante 6-OHDA em modelo *in vitro* de degeneração, as células de neuroblastoma humano Be(2)-M17, em placa de 24 poços, com 150.000 células por poço, receberam a DL50 de 6-OHDA. Após 1 h e 30 minutos de incubação, o agente estressor foi retirado e diferentes concentrações de doses terapêuticas de mitocôndrias íntegras, provenientes de células de neuroblastoma humano Be(2)-M17 saudáveis, foram administradas veiculadas em tampão de isolamento isotônico sem BSA. 22 h depois, foram registradas imagens ilustrativas de cada poço, utilizando EVOS Cell Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific). 22 h e 30 minutos depois da retirada da 6-OHDA, foi realizada a mensuração da viabilidade celular por ensaio de MTT.

3. Resultados e discussão

3.1 Modelo de neurodegeneração

Para avaliar os aspectos tecnológicos do transplante de mitocôndrias, foi estabelecido um modelo *in vitro* de degeneração, com o objetivo subsequente de administrar mitocôndrias íntegras autólogas e analisar a capacidade de reversão potencial da degeneração com a quantificação da viabilidade celular (**Fig. 2**). Para isso, a linhagem celular de neuroblastoma humano Be(2)-M17 foi desafiada com a 6-OHDA, um neurotóxico que induz estresse oxidativo e danifica estruturas como citoesqueleto, núcleo e mitocôndrias (Simola; Morelli; Carta, 2007). Tanto o modelo celular quanto o agente estressor estão muito presentes em estudos de neurociência (Huang et al. 2016; Choi et al. 2017), como por exemplo em modelos pré-clínicos da doença de Parkinson (Bisaglia et al. 2010), uma neurodegeneração associada com disfunções mitocondriais (Moon; Paek, 2015).

FIGURA 2

O modelo de degeneração *in vitro* com a 6-OHDA foi determinado com a identificação da dose letal que reduz em 50 % a viabilidade celular (DL50). Para isso, foi realizada uma curva de toxicidade com 6-OHDA, em que as células de neuroblastoma humano foram incubadas por 1h e 30 min com diferentes concentrações do agente estressante. 22 h e 30 min após a remoção da 6-OHDA, a viabilidade celular foi determinada com o ensaio de MTT (**Fig. 3**). O resultado

indicou que a DL50 da 6-OHDA é 20 μM - concentração que foi usada nos subsequentes experimentos.

FIGURA 3

Para a avaliação das potenciais disfunções mitocondriais resultantes do desafio com a 6-OHDA, no modelo de degeneração *in vitro* estabelecido, foi analisada a perda do potencial de membrana mitocondrial. Para isso, após a incubação por 1h e 30min com a 6-OHDA, as células de neuroblastoma humano foram incubadas com o fluoróforo JC-1 - um indicador da funcionalidade da organela. Assim, a marcação de células de neuroblastoma humano com JC-1 sugere que as mitocôndrias dessas células apresentam um moderado, porém estatisticamente significativo, estado de despolarização de cerca de 25%, em relação ao controle (**Fig. 4**). Como controle positivo da despolarização, foi utilizado o ionóforo de protons carbonil cianetop-Trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP), que apresentou uma taxa de despolarização de 65%. Esse resultado contribui para a validação do modelo *in vitro* de degeneração para estudos de transplante de mitocôndrias, justamente por apresentar, após 1h 30 min de incubação com 6-OHDA, o início do processo de disfunção mitocondrial e degeneração. Dessa forma, foi estabelecido, no modelo de referência, o período de 1h e 30min para o início do tratamento com mitocôndrias íntegras, com o propósito de avaliar a capacidade terapêutica de reversão do processo de degeneração, em contraste com outras abordagens, de caráter neuroprotetor, com a administração prévia ao início da degeneração.

FIGURA 4

3.2 Isolamento mitocondrial isotônico de células de neuroblastoma humano

Para o isolamento de mitocôndrias, foram testados dois protocolos distintos, em células de neuroblastoma humano. O primeiro método, denominado “Isolamento mitocondrial isotônico”, foi realizado assim como reportado em Klamt (Klamt; Shacter, 2005) (**Fig. 1A**). O protocolo foi selecionado por ser relativamente simples - vantagem importante para uma técnica que busca, no futuro, a translação clínica - e por incluir as principais etapas básicas observadas na literatura de isolamentos mitocondriais. Para a validação do método de isolamento, foram avaliados parâmetros de rendimento, com a técnica de BCA, e qualidade, através do perfil de respiração das organelas obtidas, utilizando o método de respirometria de alta resolução

(Oroboros O2k). Assim, foi constatado que o protocolo de isolamento mitocondrial isotônico não é eficiente para a obtenção de mitocôndrias funcionais de neuroblastoma humano, uma vez que resultou em um rendimento de menos de 0,01 µg de proteínas mitocondriais por milhão de células, e falta de detecção de consumo de oxigênio com a respirometria de alta resolução (**Fig. 5A**).

FIGURA 5

3.3 Isolamento mitocondrial com choque hipotônico de células de neuroblastoma humano

Para a otimização da técnica de isolamento mitocondrial, o segundo protocolo foi desenvolvido a partir do primeiro método, com modificações baseadas no trabalho de Panov (Panov, 2013), e foi denominado “Isolamento mitocondrial com choque hipotônico”. Como apresentado na **Fig. 1B**, esse protocolo difere do primeiro em alguns pontos. A principal modificação consistiu no acréscimo da etapa de lise osmótica, incubando as células de neuroblastoma humano com tampão de isolamento hipotônico por 10 minutos, antes do uso do homogeneizador mecânico *potter Elvehjem*. A diminuição da osmolaridade atua contribuindo para o rompimento das células (Fernández-Vizarra et al. 2010; Patel et al. 2017). Terminada a lise mecânica, é adicionado um tampão de isolamento hipertônico - tornando a solução isotônica. A técnica de isolamento mitocondrial foi validada a partir de parâmetros de quantidade de proteínas mitocondriais obtidas e perfil de respiração das mitocôndrias íntegras, para estabelecer confiabilidade. O método de quantificação de proteínas com BCA indicou resultados satisfatórios quanto ao rendimento, com uma média de $5,154 \pm 1,73$ µg de proteínas mitocondriais por milhão de células de neuroblastoma humano em dez preparações diferentes (n=10) (**Tabela 1**). Ainda, a repetição do protocolo indicou a reprodutibilidade do método, com baixa variação do rendimento, se apresentando como um método de isolamento mitocondrial confiável.

TABELA 1

Como parâmetro para determinação da qualidade das mitocôndrias isoladas, foi monitorado o consumo de oxigênio, através de método de Respirometria de Alta Resolução, Oroboros O2k. O resultado indicou mitocôndrias funcionais com qualidade satisfatória (**Fig. 5B e 5C**). A adição seriada de substratos mitocondriais (glutamato, malato, ADP, piruvato e

succinato) foi associada com aumento do consumo de oxigênio. Foi constatado que a resposta mais intensa de respiração ocorreu após a adição de succinato, em comparação, por exemplo, com os substratos do complexo I. Ainda, os substratos glutamato e malato apresentaram efeitos menos pronunciados, em comparação com o succinato, podendo indicar que o perfil de respiração das mitocôndrias está mais associado com o complexo II da cadeia respiratória, que interage diretamente com o succinato, em detrimento do complexo I, que é representado mais pelo glutamato e malato (Tretter; Patocs; Chinopoulos, 2016). Em seguida, foi adicionado às mitocôndrias o citocromo C, um indicador da qualidade, pois este só ingressa na organela se houver alguma perda da integridade da membrana externa mitocondrial. O citocromo C atua no transporte de elétrons da cadeia respiratória, e está associado com o aumento do consumo de oxigênio (Puchowicz et al. 2004). Na **Figura 5B e 5C**, a falta de alteração da respiração após a adição do citocromo C é um indicativo da integridade da membrana das organelas isoladas (Kunz et al. 2000). Esse parâmetro de qualidade da organela pode ser expresso pelo fator de controle do citocromo C que, no caso, resultou em uma média de $0,234 \pm 0,02$ em três preparações independentes ($n=3$), refletindo a qualidade das organelas. A etapa final do monitoramento da respiração consiste em adições de agentes que bloqueiam as funções respiratórias. A partir da adição da oligomicina, que bloqueia a ATP sintase, é possível mensurar o consumo de oxigênio envolvido com a produção de ATP. A detecção de uma taxa de consumo de oxigênio após a administração da oligomicina aponta para a presença de um desacoplamento entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP (*Proton Leak*). O FCCP, por sua vez, causa o desacoplamento da fosforilação oxidativa e possibilita a mensuração da respiração máxima. Porém, vemos que a respiração máxima já havia sido atingida com a adição de succinato, atestando mais uma vez para a funcionalidade do isolado mitocondrial. Outro indicativo da qualidade das mitocôndrias é a razão de controle respiratório (RCR), calculada pela razão do consumo máximo de oxigênio pelo consumo durante o estado de respiração de *proton leak*. O valor médio de RCR de $2,72 \pm 0,46$ em três preparações independentes ($n=3$) (**Fig. 5D**) indica que há certo desacoplamento entre a produção de ATP e a oxidação dos substratos mitocondriais, como já apontado pela observação do estado de *Proton Leak* (Gneiger, 2014). O RCR contribui para a confirmação do método de isolamento mitocondrial com choque hipotônico como uma abordagem robusta em relação a quantidade de organelas obtidas, e, ainda que resulte em organelas com certo desacoplamento, garante mitocôndrias íntegras com satisfatória capacidade respiratória.

3.3 Isolamento mitocondrial com choque hipotônico de células-tronco mesenquimais

Buscando a validação do método de isolamento mitocondrial com choque hipotônico, foi testada a reprodutibilidade da técnica, utilizando a linhagem celular de células-tronco mesenquimais. A quantificação proteica do isolamento resultou em um rendimento de 14,62 μg por milhão de células, superior ao obtido com a linhagem Be(2)-M17 (**Tabela 1**), sugerindo que células-tronco mesenquimais apresentam a vantagem de possuir mais mitocôndrias por células, em comparação com as células de neuroblastoma humano. De fato, está bem estabelecido que o conteúdo de mitocôndrias tipicamente apresenta uma relação de linearidade com o tamanho celular, onde tipos celulares maiores costumam possuir uma maior quantidade dessas organelas (Kitami et al. 2012; Rafelski et al. 2012). Ainda assim, foram constatadas baixas quantidades totais de proteínas mitocondriais resultantes do isolamento. Isso ocorreu provavelmente porque foi utilizado um menor número de células no isolamento, uma vez que as células-tronco mesenquimais apresentam um diâmetro celular consideravelmente maior comparado à células Be(2)-M17. Uma garrafa de cultura de 180 cm^2 com 80% de confluência possui apenas 2 milhões de células-tronco mesenquimais, enquanto uma cultura de células Be(2)-M17 nas mesmas condições possui aproximadamente 9 milhões de células. Isso indica que em estudos mitoterápicos deve ser considerada com cuidado a quantidade de células cultivadas necessárias para atingir as doses mitocondriais necessárias, dependendo do tipo celular doador escolhido. É possível também que o método de isolamento mitocondrial desenvolvido ainda não seja adequado para outros tipos celulares, porém o maior rendimento na análise comparativa de linhagens celulares aponta para a estabilidade da técnica de isolamento. Devido a baixa quantidade de mitocôndrias obtidas não foi possível avaliar a qualidade das organelas purificadas a partir da mensuração da taxa de consumo de oxigênio por ensaio de oximetria (**Fig. S1**). Assim, uma limitação da técnica foi imposta pela sensibilidade do aparelho de oximetria, e requer determinada quantidade mínima de organelas funcionais para uma mensuração competente do consumo de oxigênio. Por exemplo, Gnaiger, E. afirmou que a respirometria de alta resolução possibilita o estudo de mitocôndrias isoladas em quantidade menores, como 40 μg de proteínas mitocondriais (Gnaiger, 2001). Alguns dos isolamentos de células-tronco mesenquimais não atingiram tal limite mínimo.

3.4 Tratamento com mitocôndrias autólogas

Por fim, para a determinação da capacidade de reversão da degeneração, a terapia de transplante de mitocôndrias íntegras autólogas foi testada utilizando a condição de degeneração

in vitro previamente estabelecida (**Fig. 2**). Foram aplicadas 4 doses terapêuticas potenciais (1,25 µg; 2,5 µg; 5 µg e 10 µg). A escolha dos valores ocorreu após avaliação da literatura existente e representam uma relação de 1,45X a 11,6X a quantidade de proteínas mitocondriais estimada para 150 mil células Be(2)-M17 em cada poço da placa de 24 (Gollihue et al. 2017; Shi et al. 2017; Robicsek et al. 2018). Infelizmente, nenhuma das doses mitocondriais avaliadas ofereceu benefício terapêutico (**Fig. 6**). O resultado atesta a dificuldade de se atingir o efeito de reversão da degeneração, em comparação com estudos que aplicam o agente benéfico com uma abordagem de neuroproteção profilática ou concomitante com o fator de estresse. Diversos são os exemplos utilizando o modelo de degeneração de 6-OHDA que buscam a neuroproteção e não a reversão do processo de morte celular *in vitro* e *in vivo* (Gong et al, 2012; Lee et al. 2018; Li et al. 2021). Realmente, a abordagem profilática de neuroproteção é mais viável, porém o presente trabalho optou pela estratégia de tratamento buscando reverter a degeneração que já está em curso – mimetizando a situação clínica em que o paciente é diagnosticado com a doença quando a degeneração é constatada. Por outro lado, existem exemplos de estudos mitoterápicos que conseguiram demonstrar efeitos positivos frente a abordagem de neurorecuperação (Cowan et al. 2016; Huang et al. 2016; Chang et al. 2021). Na **Fig. 6B**, é possível notar o caráter linear do efeito danoso da superdosagem de mitocôndrias, apresentando uma correlação de toxicidade em função do aumento da dose terapêutica administrada - principalmente nas doses de 5 e 10 µg. Concordando com isso, Kitani *et al* também reportou citotoxicidade em decorrência da adição excessiva de mitocôndrias, com decréscimo da viabilidade celular em função do aumento da dose de concentrações mitocondriais mais altas, que chegaram a 25 µg/mL (Kitani et al. 2014). Certos estudos de mitoterapia reportaram o potencial efeito danoso associado com a administração de mitocôndrias (Huang et al. 2016; Gollihue et al. 2018; Chang, 2021), que podem servir como fonte de Padrões Moleculares Associados a Efeitos Danosos (*DAMP's*). Seus componentes são reconhecidos no meio extracelular por receptores específicos (Puhm et al. 2019; Zhu et al 2018), podendo resultar em dano celular e tecidual como início e propagação de neurodegenerações (Joshi et al. 2019), sepse (Krychtiul et al. 2015), fibrose hepática (An et al. 2020) e inflamação em eventos isquêmicos (Puhm et al. 2019). O efeito tóxico em decorrência da superdosagem de mitocôndrias (a administração mais alta avaliada equivaleu a 11,6X a quantidade de proteínas mitocondriais estimadas no poço de uma placa de 24 com 150 mil células Be(2)-M17) é um aspecto importante a ser considerado durante o processo de escolha das doses terapêuticas. Assim, estratégias como a estimativa de proteínas mitocondriais por população de células podem auxiliar no direcionamento do tratamento mitoterápico. Por fim, observamos que a menor quantidade, 1,25 µg, ainda que não significativa, indica uma

tendência de reversão da degeneração.

FIGURA 6

4. Conclusões

Em termos de aplicabilidade da mitoterapia, ainda é necessário o estabelecimento de parâmetros confiáveis de reprodutibilidade e capacidade de reversão dos danos celulares. Vários são os aspectos técnicos que impactam na capacidade de reversão da degeneração celular. No presente trabalho, foi desenvolvido um protocolo de isolamento mitocondrial, validado com técnica de respirometria, que demonstrou estabilidade em termos de rendimento de proteínas mitocondriais, mas não reprodutibilidade quando aplicado em outras linhagens celulares. Ainda, após estabelecida uma condição de degeneração *in vitro*, foi constatado o potencial efeito tóxico do transplante autólogo de mitocôndrias.

Referências

- Alexander, J.F., Sua, A.V., Arroyo, L.D., Ray, P.R., Wangzhou, A., Heiß-Lückemann, L., Schedlowski, M., Price, T.J., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., 2021. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. *Theranostics* 11, 3109–3130. <https://doi.org/10.7150/thno.53474>
- An, P., Wei, L. L., Zhao, S., Sverdlov, D. Y., Vaid, K. A., Miyamoto, M., Kuramitsu, K., Lai, M., & Popov, Y. V., 2020. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nature communications*, 11(1), 2362. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16092-0>
- Bisaglia, M., Greggio, E., Maric, D., Miller, D. W., Cookson, M. R., & Bubacco, L., 2010. Alpha-synuclein overexpression increases dopamine toxicity in BE2-M17 cells. *BMC neuroscience*, 11, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-41>
- Chang, J.-C., Chao, Y.-C., Chang, H.-S., Wu, Y.-L., Chang, H.-J., Lin, Y.-S., Cheng, W.-L., Lin, T.-T., Liu, C.-S., 2021. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. *Scientific Reports* 11. doi:10.1038/s41598-021-90094-w
- Chang, J.-C., Hoel, F., Liu, K.-H., Wei, Y.-H., Cheng, F.-C., Kuo, S.-J., Tronstad, K.J., Liu, C.-S., 2017. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci. Rep.* 7, 10710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10870-5>
- Chang, J.-C., Wu, S.-L., Liu, K.-H., Chen, Y.-H., Chuang, C.-S., Cheng, F.-C., Su, H.-L., Wei, Y.-H., Kuo, S.-J., Liu, C.-S., 2016. Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl. Res.* 170, 40-56.e3. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.12.003>
- Choi, J. H., Jeong, Y. J., Yu, A. R., Yoon, K. S., Choe, W., Ha, J., Kim, S. S., Yeo, E. J., & Kang, I.,

2017. Fluoxetine induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress via mitogen-activated protein kinase activation and histone hyperacetylation in SK-N-BE(2)-M17 human neuroblastoma cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 22(9), 1079–1097. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1390-2> (Retraction published *Apoptosis*. 2022 Sep 30;:)
- Cowan, D.B., Yao, R., Akurathi, V., Snay, E.R., Thedsanamoorthy, J.K., Zurakowski, D., Ericsson, M., Friehs, I., Wu, Y., Levitsky, S., Nido, P. D., Packard, A. B., McCully, J. D., 2016. Intracoronary Delivery of Mitochondria to the Ischemic Heart for Cardioprotection. *PloS one*, 11(8), e0160889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160889>.
- Emani, S. M., Piekarski, B. L., Harrild, D., Del Nido, P. J., & McCully, J. D., 2017. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 154(1), 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.02.018>
- Fernández-Vizarrá, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., & Enríquez, J. A., 2010. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion*, 10(3), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.12.148>
- Gnaiger E., 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration physiology*, 128(3), 277–297. [https://doi.org/10.1016/s0034-5687\(01\)00307-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00307-3)
- Gnaiger E., 2014. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. 4 th ed. Mitochondr Physiol Network 19.12. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck: 80 pp.
- Gollihue, J. L., Patel, S. P., Mashburn, C., Eldahan, K. C., Sullivan, P. G., & Rabchevsky, A. G., 2017. Optimization of mitochondrial isolation techniques for intraspinal transplantation procedures. *Journal of neuroscience methods*, 287, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.023>
- Gollihue, J. L., Patel, S. P., Eldahan, K. C., Cox, D. H., Donahue, R. R., Taylor, B. K., Sullivan, P. G., & Rabchevsky, A. G., 2018. Effects of Mitochondrial Transplantation on Bioenergetics, Cellular Incorporation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma*, 35(15), 1800–1818. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5605>
- Gong, L., Zhang, Q. L., Zhang, N., Hua, W. Y., Huang, Y. X., Di, P. W., Huang, T., Xu, X. S., Liu, C. F., Hu, L. F., & Luo, W. F. (2012). Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3 β signaling pathway. *Journal of neurochemistry*, 123(5), 876–885. <https://doi.org/10.1111/jnc.12038>
- Huang, P.-J., Kuo, C.-C., Lee, H.-C., Shen, C.-I., Cheng, F.-C., Wu, S.-F., Chang, J.-C., Pan, H.-C., Lin, S.-Z., Liu, C.-S., Su, H.-L., 2016. Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. *Cell Transplant*. 25, 913–927. <https://doi.org/10.3727/096368915X689785>
- Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddelow, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., Dorn, G. W., 2nd, & Mochly-Rosen, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nature neuroscience*, 22(10), 1635–1648. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0>
- Kitami, T., Logan, D.J., Negri, J., Hasaka, T., Tolliday, N.J., Carpenter, A.E., Spiegelman, B.M., Mootha, V.K., 2012. A Chemical Screen Probing the Relationship between Mitochondrial Content and Cell Size. *PLOS ONE* 7, e33755.. doi:10.1371/journal.pone.0033755
- Kitani, T., Kami, D., Matoba, S., Gojo, S., 2014. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 1694–1703. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12316>
- Klamt, F., Shacter, E., 2005. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J. Biol. Chem.* 280, 21346–21352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501170200>
- Konari, N., Nagaishi, K., Kikuchi, S., & Fujimiya, M., 2019. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Scientific reports*, 9(1), 5184. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40163-y>

- Krychtiuk, K. A., Ruhittel, S., Hohensinner, P. J., Koller, L., Kaun, C., Lenz, M., Bauer, B., Wutzlhofer, L., Draxler, D. F., Maurer, G., Huber, K., Wojta, J., Heinz, G., Niessner, A., & Speidl, W. S. (2015). Mitochondrial DNA and Toll-Like Receptor-9 Are Associated With Mortality in Critically Ill Patients. *Critical care medicine*, 43(12), 2633–2641. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001311>
- Kunz, W. S., Kudin, A., Vielhaber, S., Elger, C. E., Attardi, G., & Villani, G., 2000. Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 275(36), 27741–27745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004833200>
- Lee, J., Song, K., Huh, E., Oh, M. S., & Kim, Y. S., 2018. Neuroprotection against 6-OHDA toxicity in PC12 cells and mice through the Nrf2 pathway by a sesquiterpenoid from *Tussilago farfara*. *Redox biology*, 18, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.015>
- Li, J., Li, R., Wu, X., Hoo, R. L., Lee, S. M., Cheung, T. M., Ho, B. S., & Leung, G. P., 2021. *Amauroderma rugosum* Protects PC12 Cells against 6-OHDA-Induced Neurotoxicity through Antioxidant and Antiapoptotic Effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 6683270. <https://doi.org/10.1155/2021/6683270>
- Lin, M. W., Fang, S. Y., Hsu, J. C., Huang, C. Y., Lee, P. H., Huang, C. C., Chen, H. F., Lam, C. F., & Lee, J. S., 2022. Mitochondrial Transplantation Attenuates Neural Damage and Improves Locomotor Function After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Frontiers in neuroscience*, 16, 800883. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.800883>
- Ma, H., Jiang, T., Tang, W., Ma, Z., Pu, K., Xu, F., Chang, H., Zhao, G., Gao, W., Li, Y., Wang, Q., 2020. Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 134, 2161–2175. <https://doi.org/10.1042/CS20200530>
- Masuzawa, A., Black, K.M., Pacak, C.A., Ericsson, M., Barnett, R.J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D.B., Levitsky, S., Cowan, D.B., McCully, J.D., 2013. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 304, H966–H982. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00883.2012>
- Moon, H.E., Paek, S.H., 2015. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol.* 24, 103–116. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.2.103>
- Moskowitzova, K., Orfany, A., Liu, K., Ramirez-Barbieri, G., Thedsanamoorthy, J. K., Yao, R., Guariento, A., Doulamis, I. P., Blitzer, D., Shin, B., Snay, E. R., Inkster, J., Iken, K., Packard, A. B., Cowan, D. B., Visner, G. A., Del Nido, P. J., & McCully, J. D., 2020. Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 318(1), L78–L88. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2019>
- Nascimento-Dos-Santos, G., de-Souza-Ferreira, E., Lani, R., Faria, C. C., Araújo, V. G., Teixeira-Pinheiro, L. C., Vasconcelos, T., Gonçalo, T., Santiago, M. F., Linden, R., Galina, A., & Petrs-Silva, H., 2020. Neuroprotection from optic nerve injury and modulation of oxidative metabolism by transplantation of active mitochondria to the retina. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165686. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165686>
- Pacak, C. A., Preble, J. M., Kondo, H., Seibel, P., Levitsky, S., Del Nido, P. J., Cowan, D. B., & McCully, J. D., 2015. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biology open*, 4(5), 622–626. <https://doi.org/10.1242/bio.201511478>
- Panov, A., 2013. *Practical Mitochondriology. Pitfalls and Problems in Studies of Mitochondria*, Amazon, Lexington, Ky, USA.
- Patel, D., Rorbach, J., Downes, K., Szukszto, M.J., Pekalski, M.L., Minczuk, M., 2017. Macropinocytic entry of isolated mitochondria in epidermal growth factor-activated human osteosarcoma cells. *Sci. Rep.* 7, 12886. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13227-0>
- Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J. D., Willis, C. M., Manferrari, G., Rogall, R., Fernandez-Vizarra, E., Williamson, J. C., Braga, A., van den Bosch, A., Leonardi, T., Krzak, G., Kittel, Á., Benincá, C., Vicario, N., Tan, S., Bastos, C., Bicci, I., Iraci, N., Smith, J. A., Peacock, B., ... Pluchino, S., 2021. Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. *PLoS biology*, 19(4), e3001166. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001166>

- Puchowicz, M. A., Varnes, M. E., Cohen, B. H., Friedman, N. R., Kerr, D. S., & Hoppel, C. L., 2004. Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria--case studies. *Mitochondrion*, 4(5-6), 377–385.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.004>
- Puhm, F., Afonyushkin, T., Resch, U., Obermayer, G., Rohde, M., Penz, T., Schuster, M., Wagner, G., Rendeiro, A. F., Melki, I., Kaun, C., Wojta, J., Bock, C., Jilma, B., Mackman, N., Boilard, E., & Binder, C. J., 2019. Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells. *Circulation research*, 125(1), 43–52.<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314601>
- Rafelski, S. M., Viana, M. P., Zhang, Y., Chan, Y. H., Thorn, K. S., Yam, P., Fung, J. C., Li, H., Costa, L., & Marshall, W. F. (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 822–824. <https://doi.org/10.1126/science.1225720>
- Robicsek, O., Ene, H. M., Karry, R., Ytzhaki, O., Asor, E., McPhie, D., Cohen, B. M., Ben-Yehuda, R., Weiner, I., & Ben-Shachar, D., 2018. Isolated Mitochondria Transfer Improves Neuronal Differentiation of Schizophrenia-Derived Induced Pluripotent Stem Cells and Rescues Deficits in a Rat Model of the Disorder. *Schizophrenia bulletin*, 44(2), 432–442.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbx077>.
- Shi, X., Zhao, M., Fu, C., & Fu, A., 2017. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*, 34, 91–100.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.02.005>
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R.. 2007. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 11(3-4), 151–167. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>
- Tretter, L., Patocs, A., & Chinopoulos, C., 2016. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(8), 1086–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.012>
- Wu, S., Zhang, A., Li, S., Chatterjee, S., Qi, R., Segura-Ibarra, V., Ferrari, M., Gupte, A., Blanco, E., Hamilton, D.J., 2018. Polymer Functionalization of Isolated Mitochondria for Cellular Transplantation and Metabolic Phenotype Alteration. *Adv. Sci.* 5, 1700530.
<https://doi.org/10.1002/advs.201700530>
- Xie, Q., Zeng, J., Zheng, Y., Li, T., Ren, J., Chen, K., Zhang, Q., Xie, R., Xu, F., Zhu, J., 2021. Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 1–21.
<https://doi.org/10.1155/2021/1006636>
- Yan, C., Ma, Z., Ma, H., Li, Q., Zhai, Q., Jiang, T., Zhang, Z., Wang, Q., 2020. Mitochondrial Transplantation Attenuates Brain Dysfunction in Sepsis by Driving Microglial M2 Polarization. *Mol. Neurobiol.* 57, 3875–3890. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01994-3>
- Zhu, L., Zhang, J., Zhou, J., Lu, Y., Huang, S., Xiao, R., Yu, X., Zeng, X., Liu, B., Liu, F., Sun, M., Dai, M., Hao, Q., Li, J., Wang, T., & Hu, Q., 2016. Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Oncotarget*, 7(31), 48925–48940.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10596>.
- Zhu, M., Barbas, A. S., Lin, L., Scheuermann, U., Bishawi, M., & Brennan, T. V., 2018. Mitochondria Released by Apoptotic Cell Death Initiate Innate Immune Responses. *ImmunoHorizons*, 2(11), 384–397. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800063>

Legendas das figuras e tabelas

Figura 1. Comparação dos protocolos de isolamento mitocondrial. Apresentação comparativa do (a) isolamento mitocondrial isotônico (Klamt; Shacter, 2005) e (b) isolamento mitocondrial com choque hipotônico (Panov, 2013). Cada método foi descrito de forma detalhada nos Materiais e Métodos (*sessão 2.3*). O sinal ‘*’ indica a etapa de retirada de uma alíquota para contagem de células em câmara de Neubauer. O sinal ‘#’ indica a etapa de retirada de uma alíquota para a quantificação de proteínas por ensaio de BCA.

Figura 2. Cronograma do modelo de referência *in vitro* de estudos mitoterápicos. Um dia antes do desafio com a DL50 da 6-OHDA, as células de neuroblastoma humano foram dispostas em placas de 24 poços. As células foram incubadas com o neurotóxico por 1h e 30min e, após a retirada da 6-OHDA, foram administradas doses terapêuticas de mitocôndrias íntegras autólogas recentemente isoladas de células de neuroblastoma humano saudáveis. 22h e 30min depois, a viabilidade celular foi mensurada com o ensaio de MTT.

Figura 3. Curva de neurotoxicidade da 6-OHDA. Avaliação de viabilidade da cultura celular da linhagem Be(2)-M17 disposta em placa de 24 poços, incubadas com diferentes concentrações (15 μ M; 20 μ M; 25 μ M; 30 μ M) de 6-OHDA por 1h30min. (a) Curva de toxicidade com a viabilidade celular em relação ao controle (eixo y) em função da concentração de 6-OHDA (eixo x). (b) Representação gráfica em colunas da dose letal que diminui a viabilidade da cultura em 50% (DL50). (n=5)

Figura 4. Potencial de membrana mitocondrial. Determinação com JC-1 do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) em cultura de células de neuroblastoma humano após a incubação de 1,5h com 20 μ M de 6-OHDA. Para o controle positivo da despolarização da membrana mitocondrial foi utilizado o desacoplador de membrana mitocondrial FCCP. (n=4)

Figura 5. Oximetria de alta resolução do isolamento mitocondrial de células de neuroblastoma humano. Respirimetria registrada com o equipamento Oroboros-O2k. A curva azul demonstra a concentração de oxigênio na *chamber* selada, e a curva vermelha representa o consumo de oxigênio pela quantidade de proteínas mitocondriais. Para a determinação do perfil de consumo de oxigênio em função do tempo, foram realizadas administrações sequenciais de substratos mitocondriais (Glutamato 2M (glut), Malato 0,8 M (mal), ADP 0,5 M (ADP), Piruvato 2M (pir)

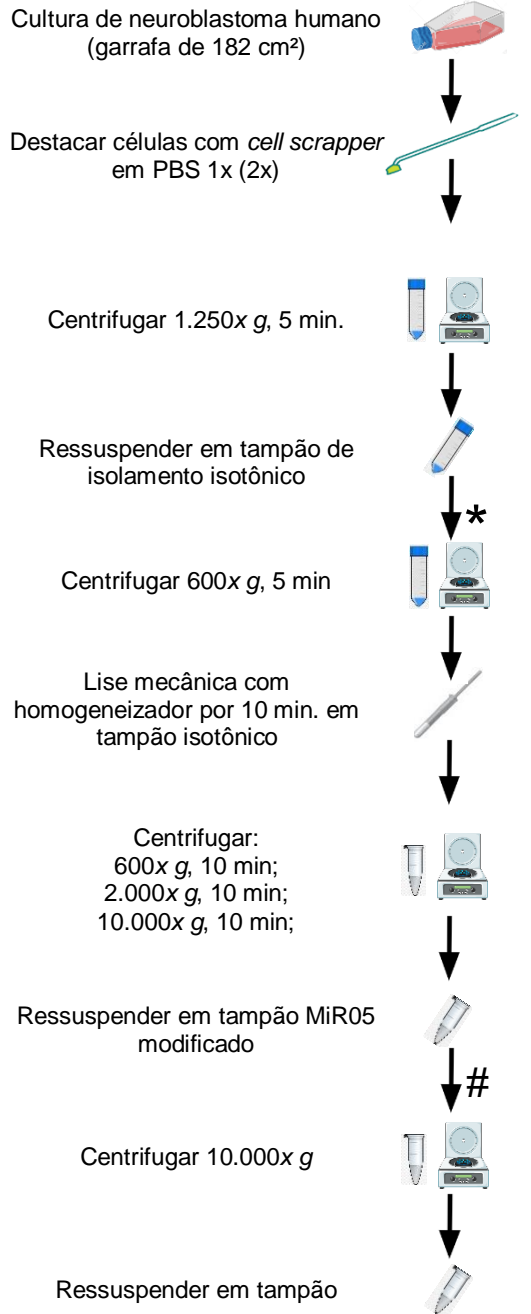
e Succinato 1M (suc)), Citocromo C 4 mM (cit), Oligomicina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (oligo), FCCP 1 mM (fccp), Rotenona 1 mM (rot) e Antimicina 5 mM (ama). (a) Registro indicando ausência de mitocôndrias funcionais obtidas com o protocolo de isolamento mitocondrial isotônico de células de neuroblastoma humano. (b) Oximetria monitorando o consumo de oxigênio de mitocôndrias obtidas com o protocolo de isolamento mitocondrial com choque hipotônico em células de neuroblastoma humano. Ao lado, indicação dos parâmetros respectivos de cada experimento realizado, informando a respeito de concentração de proteínas mitocondriais ($\mu\text{g}/10^6$) obtidas através de método de BCA (n=10), razão de controle respiratório (RCR) e fator de controle de citocromo C. (n=3) (c) Representação gráfica da média dos resultados obtidos na (b), com a Taxa de consumo de oxigênio (pmol/s mg prot) no eixo 'y' em função do tempo (Minutos) no eixo 'x'. (d) Indicação gráfica dos parâmetros respectivos de cada experimento contidos na (b).

Figura 6. Transplante de mitocôndrias autólogas em modelo de células de neuroblastoma humano. Tratamento com diferentes doses de mitocôndrias funcionais obtidas de células de neuroblastoma humano e incubadas por 22h e 30min com células de neuroblastoma humano previamente desafiadas por 1h30min com 6-OHDA (a) Imagens ilustrativas obtidas com EVOS Cell Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific) dos grupos experimentais: Veículo (ácido ascórbico), 20 μM 6-OHDA, doses mitocôndrias (1,25 μg ; 2,5 μg ; 5 μg e 10 μg) e doses mitocondriais após o desafio com 20 μM de 6-OHDA. (b) Gráfico representando viabilidade celular em função dos diferentes grupos experimentais. No grupo tampão foi administrado apenas o tampão de isolamento isotônico sem BSA. (n=4)

Tabela 1. Rendimento do isolamento de mitocondriais com choque hipotônico de células de neuroblastoma humano e células-tronco mesenquimais. Quantificação de proteínas mitocondriais através do método de BCA com o método de isolamento mitocondrial com choque hipotônico, expresso em proteínas mitocondriais por milhão de células ($\mu\text{g}/10^6$ células). Comparação do rendimento utilizando células de neuroblastoma humano (n=11) e células-tronco mesenquimais (n=3).

Figuras

a) Protocolo de Isolamento Mitocondrial Isotônico



b) Protocolo de Isolamento Mitocondrial com Choque Hipotônico

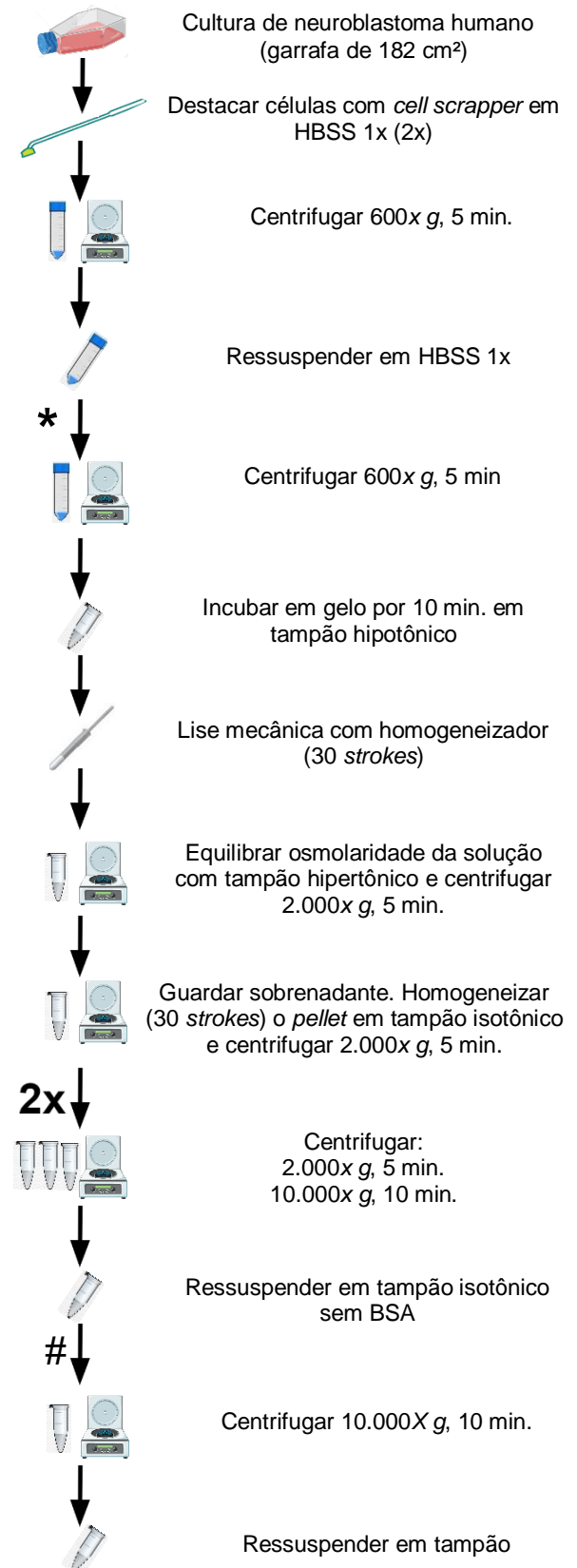


Figura 1. Comparação dos protocolos de isolamento mitocondrial.

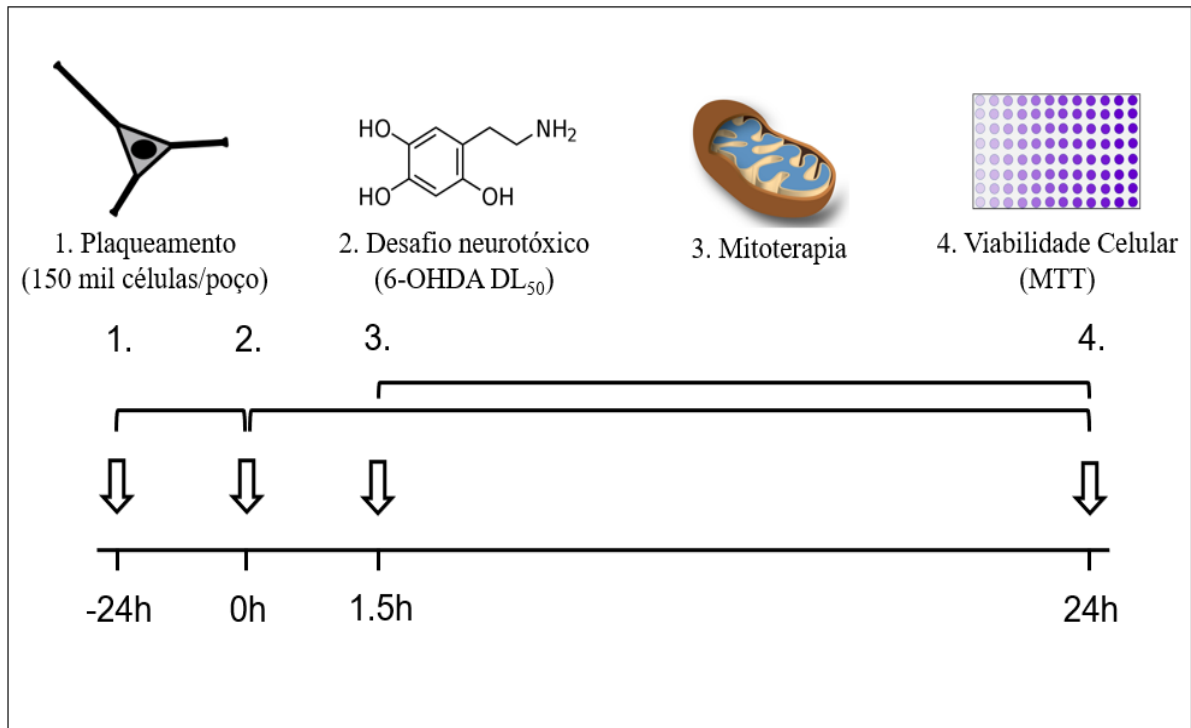


Figura 2. Cronograma do modelo de referência *in vitro* de estudos mitoterápicos.

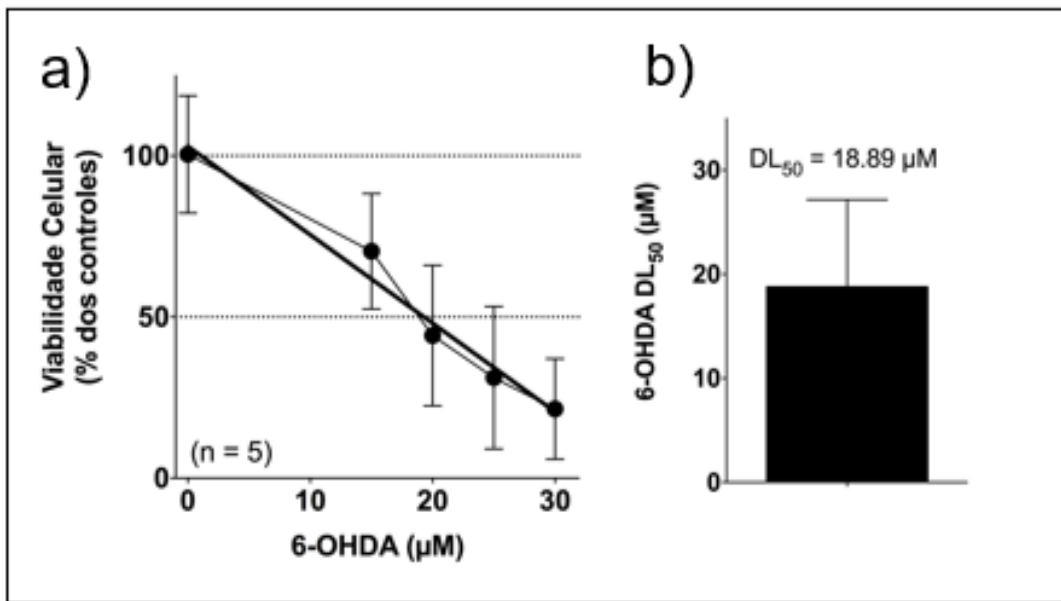


Figura 3. Curva de neurotoxicidade da 6-OHDA.

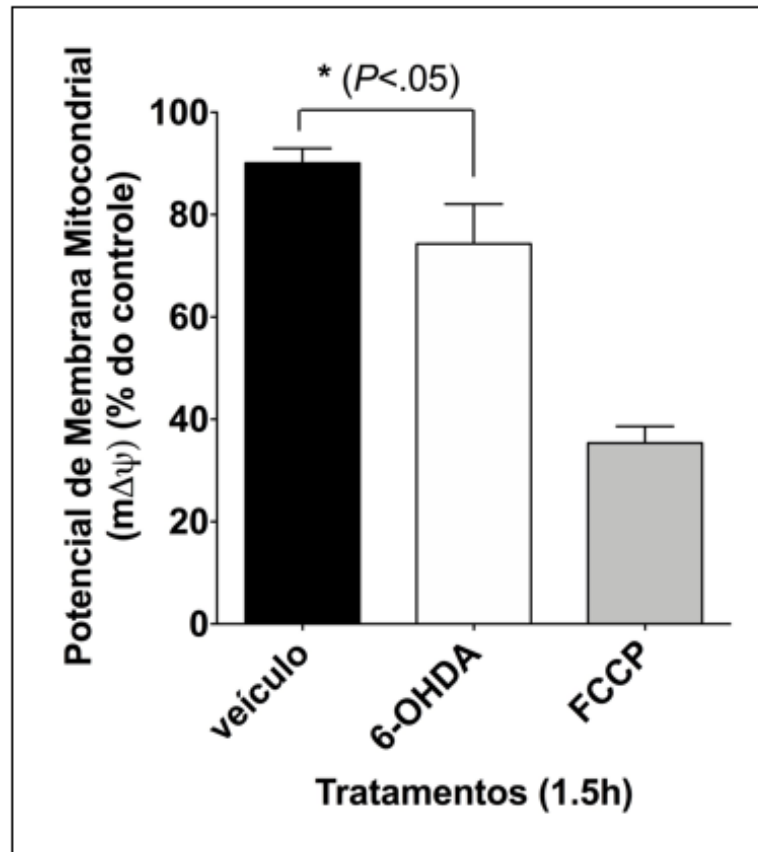
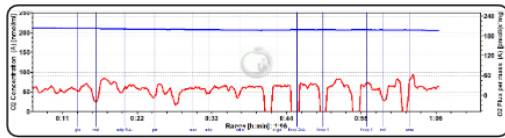


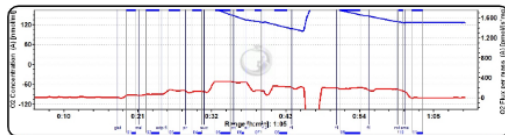
Figura 4. Potencial de membrana mitocondrial.

a) Protocolo Isotônico
(Klamm *et al.*, 2005)

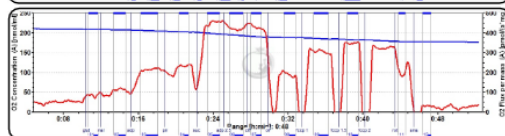


[Prot]: N.D.
RCR: N.D.
Cyt c Factor: N.D.

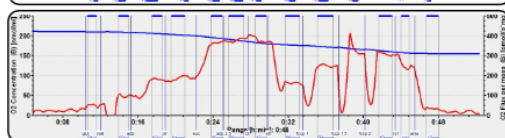
b) Protocolo Choque Hipotônico
(Pavanov 2013)



[Prot]: 11,66 $\mu\text{g}/10^6$
RCR: 2,286
Cyt c Factor: 0,254

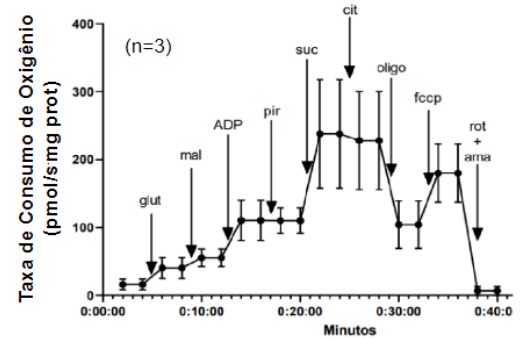


[Prot]: 5,58 $\mu\text{g}/10^6$
RCR: 2,692
Cyt c Factor: 0,204



[Prot]: 6,06 $\mu\text{g}/10^6$
RCR: 3,205
Cyt c Factor: 0,245

c)



d)

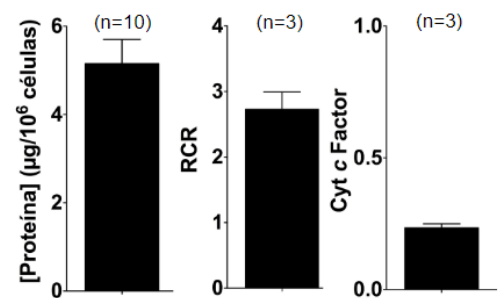


Figura 5. Oximetria de alta resolução do isolamento mitocondrial de células de neuroblastoma humano.

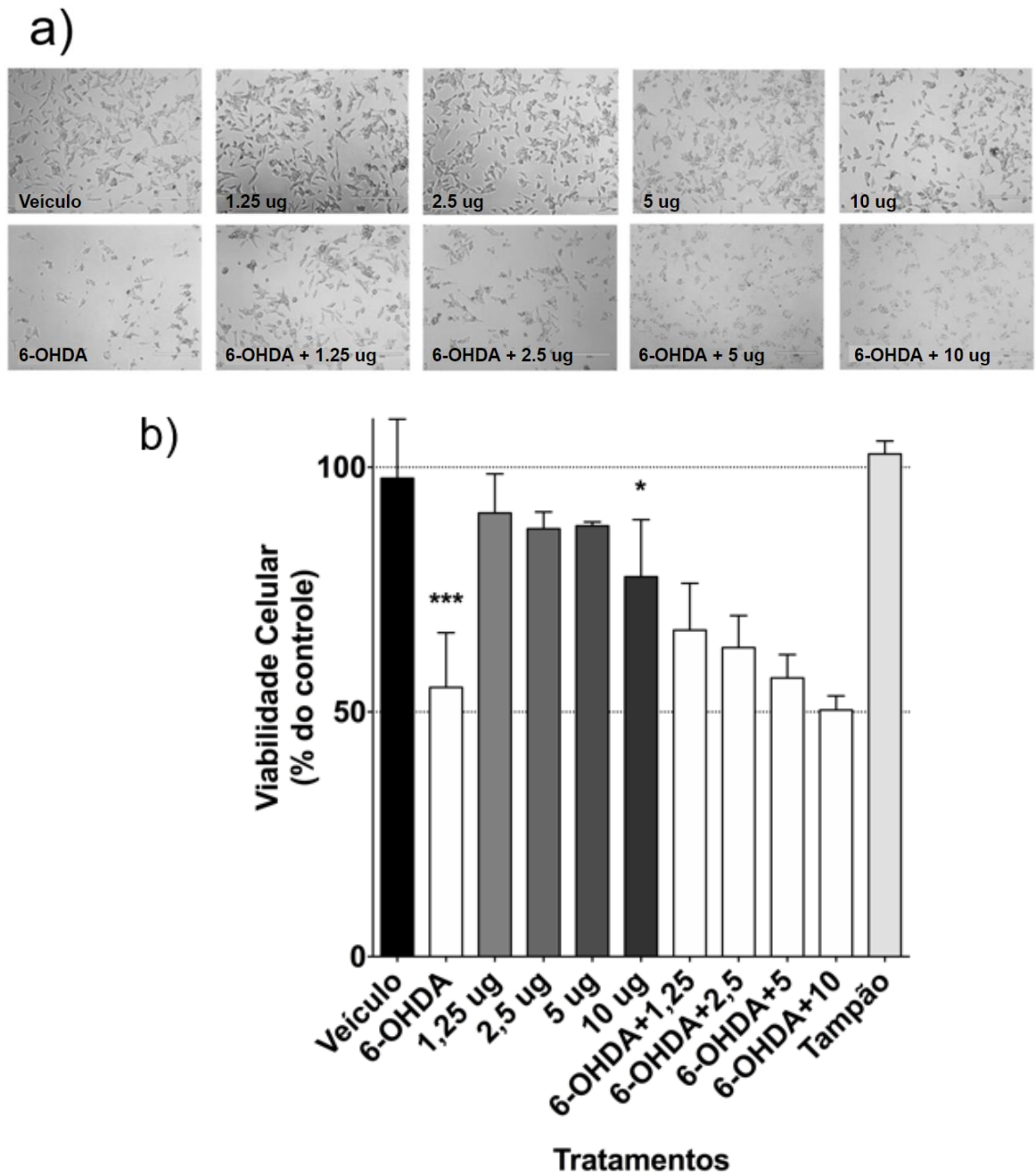


Figura 6. Transplante de mitocôndrias autólogas em modelo de células de neuroblastoma humano.

Lista de tabelas

Quantidade de proteínas mitocondriais por milhão de células		
	Be(2)-M17 ($\mu\text{g} / 10^6$ células)	MSC ($\mu\text{g} / 10^6$ células)
	5,58	—
	6,06	—
	3,22	—
	4,31	—
	4,16	—
	2,97	—
	6,97	—
	7,02	6,42
	7,70	8,42
	3,55	29
Médias	5,15	14,61

Tabela 1. Rendimento do isolamento de mitocondriais com choque hipotônico de células de neuroblastoma humano e células-tronco mesenquimais.

Legenda figura suplementar

Figura S1. Oximetria de alta resolução do isolamento mitocondrial de células-tronco mesenquimais obtido pelo método de choque hipotônico. Imagens ilustrativas (a, b, c) da leitura alterada do equipamento Oroboros O2k, em decorrência da baixa quantidade de mitocôndrias de células-tronco mesenquimais obtidas com o isolamento mitocondrial com choque hipotônico. A curva azul demonstra a concentração de oxigênio na *chamber* selada, e a curva vermelha representa o consumo de oxigênio pela quantidade de proteínas mitocondriais. Para a determinação do perfil de consumo de oxigênio em função do tempo, foram realizadas administrações sequenciais de ADP 0,5 M (ADP), Succinato 1M (suc), Citocromo C, 4 mM (cit), Oligomicina 2 µg/mL (oligo) e FCCP 1 mM (fccp). (n=3)

Figura Suplementar

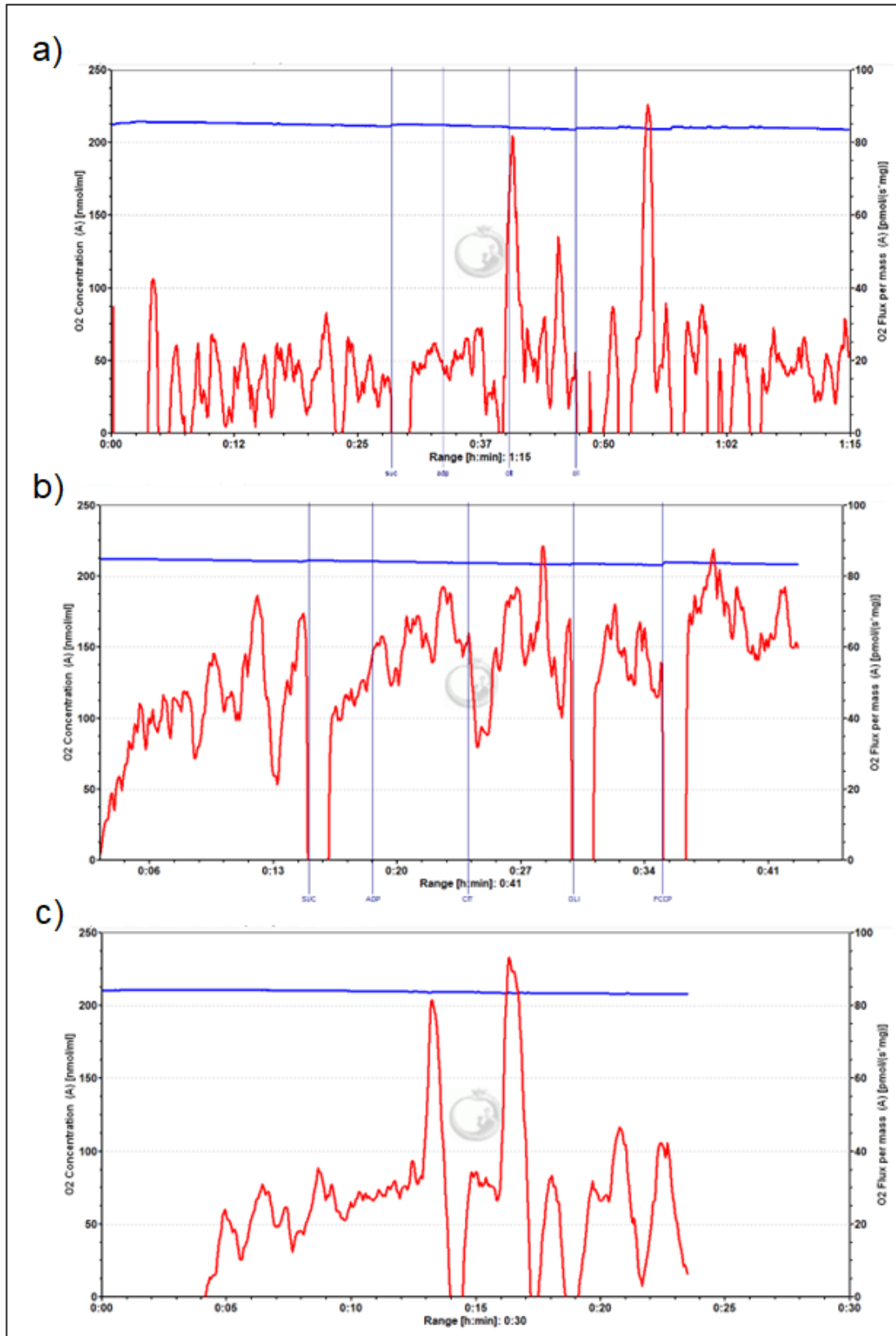


Figura S1. Oximetria de alta resolução do isolamento mitocondrial de células-tronco mesenquimais obtido pelo método de choque hipotônico.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Vários são os aspectos técnicos da administração de mitocôndrias íntegras que impactam na capacidade de reversão do estresse celular, e influenciam em parâmetros de confiabilidade e reprodutibilidade. A partir da padronização de um cenário de degeneração *in vitro* utilizando células de neuroblastoma humano desafiadas com 6-OHDA, foram demonstrados que fatores, como tipo celular doador de mitocôndrias, protocolo de isolamento mitocondrial, e dose terapêutica, impactam na capacidade de reversão da degeneração. Foi observado, ainda, correlação de toxicidade associada com a superdosagem de mitocôndrias. Diversas das características técnicas avaliadas afetam e podem representar um fator limitante para a otimização e aplicabilidade da mitoterapia. Dessa forma, a continuação dos estudos de avaliação comparativa dos métodos são fundamentais para o aprimoramento da técnica.

Em experimentos futuros será necessário validar o protocolo de isolamento mitocondrial com choque hipotônico em relação à reprodutibilidade. Para isso, serão promovidos isolamentos com linhagens celulares alternativas, atentando às características intrínsecas de cada cultura de células, e aprimorando o protocolo caso seja necessário. Com relação à mitoterapia, buscaremos encontrar uma dose terapêutica de mitocôndrias que seja capaz de reverter os efeitos degenerativos em células de neuroblastoma humano, causados por 6-OHDA. A partir disso, serão testadas mitocôndrias provenientes de outros tipos celulares no modelo de estresse celular utilizado neste trabalho - comparando os resultados e associando-os com o perfil respiratório das organelas exógenas, determinada por oximetria de alta resolução. Também, buscaremos aprimorar a qualidade da detecção dos efeitos benéficos pós-tratamento - utilizando técnicas de fluorescência para visualização da internalização de organelas exógenas e determinando a possível melhora das células de neuroblastoma humano desafiadas com 6-OHDA depois do tratamento. De forma geral, seguiremos buscando aprimorar os aspectos tecnológicos da mitoterapia.

REFERÊNCIAS

- AHARONI-SIMON, M. et al. Oxidative stress facilitates exogenous mitochondria internalization and survival in retinal ganglion precursor-like cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 5122, 2022. Disponível em: doi:10.1038/s41598-022-08747-3. Acesso em: 7 set. 2022.
- ALEXANDER, J. F. et al. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. **Theranostics**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 3109–3130, 2021. Disponível em: doi:10.7150/thno.53474. Acesso em: 7 set. 2022.
- BABENKO, V. et al. Miro1 Enhances Mitochondria Transfer from Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MMSC) to Neural Cells and Improves the Efficacy of Cell Recovery. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 687, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23030687>. Acesso em: 10 set. 2022.
- BLITZER, D., et al. Delayed Transplantation of Autologous Mitochondria for Cardioprotection in a Porcine Model. **Ann Thorac Surg**, vol. 109,3 (2020): 711-719. Disponível em: doi:10.1016/j.athoracsur.2019.06.075. Acesso em: 25 set. 2022.
- CATALDO, A. et al. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. **The American journal of pathology** vol. 177,2 (2010): 575-85. Disponível em: doi:10.2353/ajpath.2010.081068. Acesso em: 11 set. 2022.
- CHANG, J.-C. et al. Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Translational Research**, [s. l.], v. 170, p. 40-56.e3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.12.003>. Acesso em: 7 set. 2022.
- CHANG, J.-C., et al. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 14, 2021. Disponível em: doi:10.1038/s41598-021-90094-w. Acesso em: 25 set. 2022.
- CHANG, J.-C. et al. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10710, 2017. Disponível em: doi:10.1038/s41598-017-10870-5. Acesso em: 7 set. 2022.
- CHENG, X.-Y. et al. Human iPSCs derived astrocytes rescue rotenone-induced mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in vitro by donating functional mitochondria. **Translational Neurodegeneration**. [s. l.], p. 14, 2020. Disponível em: doi:10.1186/s40035-020-00190-6. Acesso em: 25 set. 2022.
- CLARK, M. A.; SHAY, J. W. Mitochondrial transformation of mammalian cells. **Nature**, [s. l.], v. 295, n. 5850, p. 605–607, 1982. Disponível em: doi:10.1038/295605a0. Acesso em: 25 set. 2022.
- COWAN, D. B. et al. Intracoronary Delivery of Mitochondria to the Ischemic Heart for

Cardioprotection. **PLOS ONE**, [s. l.], p. 19, 2016. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0160889. Acesso em: 25 set. 2022.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**. Vol. 822, Issue 1, 1-42, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90002-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90002-4). Acesso em: 10 set. 2022.

EMANI, S. M et al. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery** vol. 154,1 (2017): 286-289. Disponível em: doi:10.1016/j.jtcvs.2017.02.018. Acesso em: 25 set. 2022.

FAKIH, M. H. et al. The AUGMENTS Treatment: Physician Reported Outcomes of the Initial Global Patient Experience. **Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology**, [s. l.], v. 03, n. 03, 2015. Disponível em: doi:10.4172/2375-4508.1000154. Acesso em: 7 set. 2022.

FRIEDMAN, JR., NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**. 505, 335-374. 2014. Disponível em: doi:10.1038/nature12985. Acesso em: 10 set. 2022.

GARONE, C., TADESSE, S., HIRANO, M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. **Brain: A Journal of Neurology**. [s. l.], v. 134, n. Pt 11, p. 3326–3332, 2011. Disponível em: doi:10.1093/brain/awr245. Acesso em 20 set. 2022.

GOLLIHUE, J. L. et al. Effects of Mitochondrial Transplantation on Bioenergetics, Cellular Incorporation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **Journal of neurotrauma** vol. 35,15 (2018): 1800-1818. Disponível em: Doi:10.1089/neu.2017.5605. Acesso em: 25 set. 2022.

GOLLIHUE, J. L. et al. Optimization of Mitochondrial Isolation Techniques for Intraspinal Transplantation Procedures. **Journal of neuroscience methods** vol. 287 (2017): 1-12. Disponível em: Doi:10.1016/j.jneumeth.2017.05.023. Acesso em: 25 set. 2022.

GORMAN, G.S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers**. 2, 16080. 2016. Disponível em: doi:10.1038/nrdp.2016.80. Acesso em: 10 set. 2022.

HAYAKAWA, K., et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. **Nature**. 535, 551-555. 2018. Disponível em: doi:10.1038/nature18928. Acesso em: 25 set. 2022.

HELBLING, D. et al. Reduced mitochondrial DNA content and heterozygous nuclear gene mutations in patients with acute liver failure. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**. Vol. 57,4 (2013): 438-43. Disponível em: doi:10.1097/MPG.0b013e31829ef4b4. Acesso em: 11 set. 2022.

HUANG, P.-J. et al. Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 25, n.m 5, p. 913–927, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/096368915X689785>. Acesso em: 7 set. 2022.

- ISLAM, MN., et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. **Nature medicine**. vol. 18,5 759-65. 15 Apr. 2012. Disponível em: doi:10.1038/nm.2736. Acesso em: 20 set. 2022.
- JOSHI, AU., et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. **Nature neuroscience**. vol. 22,10 (2019): 1635-1648. Disponível em: doi:10.1038/s41593-019-0486-0. Acesso em: 2 set 2022.
- JOUAVILLE, LS. et al. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 96,24 (1999): 13807-12. Disponível em: doi:10.1073/pnas.96.24.13807. Acesso em: 10 set. 2022.
- KAPPLER, L. et al. Linking Bioenergetic Function Of Mitochondria To Tissue-Specific Molecular Fingerprints. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. 317, E374-E378. 2019. Disponível em: doi:10.1152/ajpendo.00088.2019. Acesso em: 10 set. 2022.
- KATRANGI, E. et al. Xenogenic Transfer of Isolated Murine Mitochondria into Human ρ^0 Cells Can Improve Respiratory Function. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 561–570, 2007. Disponível em: doi:10.1089/rej.2007.0575. Acesso em: 7 set. 2022.
- KIM, M.J. et al. Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 13, 2018. Disponível em: doi:10.1038/s41598-018-21539-y. Acesso em: 25 set. 2022.
- KITANI, T. et al. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1694–1703, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12316>. Acesso em: 7 set. 2022.
- KONARI, N., et al. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. **Scientific reports** vol. 9,1 5184. 26 Mar. 2019. Disponível em: doi:10.1038/s41598-019-40163-y. Acesso em: 25 set. 2022.
- KUJOTH, G. C. et al. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5733, p. 481–484, 2005. Disponível em: DOI: 10.1126/science.1112125. Acesso em: 10 set. 2022.
- LABARTA, E. et al. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization—a randomized pilot study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 86–96, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.09.023>. Acesso em: 7 set. 2022.
- LIN, M-W., et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Neural Damage and Improves Locomotor Function After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, vol. 16 800883. 12 Apr. 2022. Disponível em: doi:10.3389/fnins.2022.800883. Acesso em: 25 set. 2022.
- LI, MX., DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000Prime**

Reports. vol. 7 42. 1 Apr. 2015. Disponível em: doi:10.12703/P7-42. Acesso em: 1 out. 2022.

MA, H. et al. Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice. **Clinical Science (London, England: 1979)**, [s. l.], v. 134, n. 16, p. 2161–2175, 2020. Disponível em: doi:10.1042/CS20200530. Acesso em: 25 set. 2022.

MACHEINER, T. et al. Magnetomitotransfer: An efficient way for direct mitochondria transfer into cultured human cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 35571, 2016. Disponível em: doi:10.1038/srep35571. Acesso em: 7 set. 2022.

MAEDA, H. et al. TAT-dextran-mediated mitochondrial transfer enhances recovery from models of reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 5007–5020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15120>. Acesso em: 7 set. 2022.

MASUZAWA, A. et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 7, p. H966–H982, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00883.2012>. Acesso em: 7 set. 2022

MISTRY, J. J. et al. ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 49, p. 24610–24619, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1913278116>. Acesso em: 10 set. 2022.

MOSKOWITZOVA, K. et al. Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** vol. 318,1 (2020): L78-L88. Disponível em: doi:10.1152/ajplung.00221.2019. Acesso em: 20 set. 2022.

NASCIMENTO-DOS-SANTOS, G., et al. Neuroprotection from optic nerve injury and modulation of oxidative metabolism by transplantation of active mitochondria to the retina. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease** vol. 1866,5 (2020): 165686. Disponível em: doi:10.1016/j.bbadis.2020.165686. Acesso em: 5 set. 2022.

OKTAY, K. et al. Oogonial Precursor Cell-Derived Autologous Mitochondria Injection to Improve Outcomes in Women With Multiple IVF Failures Due to Low Oocyte Quality: A Clinical Translation. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1612–1617, 2015. Disponível em: doi:10.1177/1933719115612137. Acesso em: 7 set. 2022.

PACAK, C. A. et al. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. **Biology Open**, [s. l.], p. 5, 2015. Disponível em: doi:10.1242/bio.201511478. Acesso em: 25 set. 2022 .

PAMENTER, ME., LAU, GY., RICHARDS, JG. Effects of cold on murine brain mitochondrial function. **PLoS one**. Vol. 31,12 e0208453. 6 Dec. 2018. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0208453. Acesso em: 10 set. 2022.

PATEL, D. et al. Macropinocytic entry of isolated mitochondria in epidermal growth factor-

activated human osteosarcoma cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12886, 2017. Disponível em: doi:10.1038/s41598-017-13227-0. Acesso em: 7 set. 2022.

PERUZZOTTI-JAMETTI, L. et al. Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. **PLOS BIOLOGY**. vol. 19,4 e3001166. 7 Apr. 2021. Disponível em: doi:10.1371/journal.pbio.3001166. Acesso em: 10 set. 2022.

PUHM, F. et al. Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells. **Circulation research**. vol. 125,1 (2019): 43-52. Disponível em: doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314601. Acesso em: 5 set. 2022.

RAMIREZ-BARBIERI, G. et al. Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. **Mitochondrion**. vol. 46 (2019): 103-115. Disponível em: doi:10.1016/j.mito.2018.03.002. Acesso em: 10 set. 2022.

ROBICSEK, O. et al. Isolated Mitochondria Transfer Improves Neuronal Differentiation of Schizophrenia-Derived Induced Pluripotent Stem Cells and Rescues Deficits in a Rat Model of the Disorder. **Schizophrenia bulletin**. vol. 44,2 (2018): 432-442. Disponível em: doi:10.1093/schbul/sbx077. Acesso em: 25 set. 2022.

SCHWARTZ, R. M.; DAYHOFF, M. O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 199, n. 4327, p. 395–403, 1978. Disponível em: doi:10.1126/science.202030. Acesso em: 25 set. 2022.

SEBASTIANI, M., et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. **Journal of the American College of Cardiology**. vol. 50,14 (2007): 1362-9. Disponível em: doi:10.1016/j.jacc.2007.06.035. Acesso em: 15 set. 2022.

SHI, X., et al. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. **Mitochondrion** vol. 34 (2017): 91-100. Disponível em: doi:10.1016/j.mito.2017.02.005. Acesso em: 25 set. 2022.

SHI, C.; GUO, H.; LIU, X. Platelet Mitochondria Transplantation Rescues Hypoxia/Reoxygenation-Induced Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Cell Death Involving the FUNDC2/PIP3/Akt/FOXO3a Axis. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 30, p. 096368972110242, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1177/09636897211024210. Acesso em: 7 set. 2022.

STENTON, SL., PROKISCH, H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. **EBioMedicine**. vol. 56 (2020): 102784. Disponível em: doi:10.1016/j.ebiom.2020.102784. Acesso em: 15 set. 2022.

SUN, C. et al. Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. **Theranostics** vol. 9,12 3595-3607. 26 May. 2019. Disponível em: doi:10.7150/thno.33100. Acesso em: 25 set. 2022.

TAKEDA, K. et al. Microinjection of serum-starved mitochondria derived from somatic cells

affects parthenogenetic development of bovine and murine oocytes. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 137–142, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.12.144>. Acesso em: 7 set. 2022

TREVINO, M. B. et al. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 317, n. 5, p. E899–E910, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00161.2019>. Acesso em: 11 set. 2022.

WANG, X. et al. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**. vol. 109 Suppl 1, Suppl 1 (2009): 153-9. Disponível em: [doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05867.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05867.x). Acesso em: 11 set. 2022.

WANG, Z.-B. et al. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue-derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice. **Aging**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2480–2488, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.101332>. Acesso em: 7 set. 2022.

WANG, X.; GERDES, H.-H. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1181–1191, 2015. Disponível em: [doi: 10.1038/cdd.2014.211](https://doi.org/10.1038/cdd.2014.211). Acesso em: 25 set. 2022.

WU, S. et al. Polymer Functionalization of Isolated Mitochondria for Cellular Transplantation and Metabolic Phenotype Alteration. **Advanced Science**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1700530, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/advs.201700530>. Acesso em: 7 set. 2022.

XIE, Q. et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/1006636>. Acesso em: 7 set. 2022.

YAN, C. et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Brain Dysfunction in Sepsis by Driving Microglial M2 Polarization. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 57, n. 9, p. 3875–3890, 2020. Disponível em: [doi:10.1007/s12035-020-01994-3](https://doi.org/10.1007/s12035-020-01994-3). Acesso em: 7 set. 2022.

YI, Y.-C. et al. Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 445–449, 2007. Disponível em: [doi:10.1007/s10815-007-9161-6](https://doi.org/10.1007/s10815-007-9161-6). Acesso em: 7 set. 2022.

ZHANG, B. et al. Effects of Brain-Derived Mitochondria on the Function of Neuron and Vascular Endothelial Cell After Traumatic Brain Injury. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 138, p. e1–e9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.11.172>. Acesso em: 7 set. 2022.

ZHOU, J. et al. Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Oncotarget**. 2016 May 24;7(21):31284-98. Disponível em: [doi: 10.18632/oncotarget.8893](https://doi.org/10.18632/oncotarget.8893). Acesso em: 10 set. 2022.

ZHU, M., et al. Mitochondria Released by Apoptotic cell death Initiate Innate Immune Responses. **ImmunoHorizons**. Vol. 2, 11 (2018)> 384-397. Disponível em: [doi:10.4049/immunohorizons.1800063](https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800063). Acesso em: 20 set. 2022.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



MITOCHONDRION

Official Journal of the Mitochondria Research Society

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1567-7249

DESCRIPTION

Mitochondrion is a definitive, high profile, peer-reviewed international research journal. The scope of *Mitochondrion* is broad, reporting on basic science of mitochondria from all organisms and from basic research to pathology and clinical aspects of mitochondrial diseases. The journal welcomes original contributions from investigators working in diverse sub-disciplines such as evolution, biophysics, biochemistry, molecular and cell biology, genetics, pharmacology, toxicology, forensic science, programmed cell death, aging, cancer and clinical features of mitochondrial diseases.

Mitochondrion includes:

MitoMatters: Editorial and news of general interest invited by Editorial Office.

Profiles and Perspectives: Invited by Editorial Office and written by senior investigators in the field.

The Mito Mew: Editorial and news of general interest.

Review Articles: Reviews of major importance in mitochondrial biology. These articles will be peer-reviewed. Articles may be of any length; however, unusually long articles should be discussed with the editor before submission.

Fast Track Articles: Peer-reviewed, short studies that are refereed rapidly and published generally within 10 weeks. These papers should be a concise complete piece of work of special significance and timeliness and should not exceed 4 printed pages (i.e., 10 pages of double-spaced typescript, including tables and figures up to a total number of 4).

Original Articles: Peer-reviewed, high-quality, concise research investigations that represent new and significant contributions to science.

Letters to the Editor: Comments on papers published in the Journal and on other matters of interest to mitochondria researcher.

Book Reviews: invited by the editorial office.

Announcements and Calendar: Providing notices of forthcoming meetings, courses, and other events relevant to mitochondria researchers.

AUDIENCE

Investigators working in diverse sub-disciplines such as evolution, biophysics, biochemistry, molecular and cell biology, genetics, pharmacology, toxicology, forensic science, programmed cell death, aging, cancer and clinical features of mitochondrial diseases.

IMPACT FACTOR

2021: 4.534 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

EMbiology
 PubMed/Medline
 Current Contents - Clinical Medicine
 Elsevier BIOBASE
 Embase
 Science Citation Index Expanded
 Research Alert
 CAS

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Keshav Singh, The University of Alabama at Birmingham, 35294-2172, Birmingham Alabama, United States of America, Fax: +1 205-934-2766

Mitochondrial genetics, mitochondrial and nuclear interactions, cancer, breast, prostate, cancer disparities, human diversity, health equity

Editorial Board Members

Yidong Bai, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, United States of America

Toni Barrientos, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, United States of America

Vilhelm Bohr, Biomedical Research Center, Lab. of Molecular Gerontology, National Institute of Aging (NIA), Baltimore, Maryland, United States of America

Richard Boles, Mitochondrial and Molecular Medicine, Pasadena, California, United States of America

Paul Brookes, University of Rochester Medical Center Department of Anesthesiology, Rochester, New York, United States of America

Maria Luisa Campo, University of Extremadura Department of Biochemistry and Molecular Biology and Genetics, Badajoz, Spain

Xin Jie Chen, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York, United States of America

Patrick F. Chinnery, Newcastle University Centre for In Vivo Imaging, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Bruce H. Cohen, Akron Children's Hospital, Akron, Ohio, United States of America

William C. Copeland, National Institute of Environmental Health Sciences Molecular and Genetic Epidemiology Group, Research Triangle Park, North Carolina, United States of America

Carsten Culmsee, University of Marburg, Marburg, Germany

Mariana Gerschenson, University of Hawai'i at Mānoa John A Burns School of Medicine, Honolulu, Hawaii, United States of America

Lawrence I. Grossman, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Michigan, United States of America

Min-Xin Guan, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, United States of America

Richard Haas, University of California San Diego, Mitochondrial Disease Laboratory, La Jolla, California, United States of America

Maureen R. Hanson, Cornell University Department of Molecular Biology and Genetics, Ithaca, New York, United States of America

Charles L. Hoppel, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, United States of America

Taosheng Huang, University at Buffalo Jacobs School of Medicine and Biomedical Sciences, Buffalo, New York, United States of America

Paul M. Hwang, National Institutes of Health, Laboratory of Cardiovascular and Cancer Genetics, Bethesda, Maryland, United States of America

Masamichi Ikawa, University of Fukui Hospital, Fukui, Japan

Daniel Inaoka, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Grazia Isaya, Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, Minnesota, United States of America

Kaori Ishikawa, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Laurie Kaguni, Michigan State University Center for Mitochondrial Science and Medicine, East Lansing, Michigan, United States of America

Brett Kaufman, University of Pittsburgh Department of Medicine, United States of America

Konstantin Khrapko, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts, United States of America

Werner Koopman, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Netherlands
John Lemasters, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, United States of America
Alfred Lewin, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, United States of America
Jiakang Liu, Xi'an Jiaotong University School of Life Science and Technology, Xi'an, China
Peter J. McGuire, National Institutes of Health (NIH), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Bethesda, United States of America
Dan Mishmar, Ben-Gurion University of the Negev, Be'er Sheva, Israel
Ian Max Møller, Aarhus University Department of Molecular Biology and Genetics Flakkebjerg, Slagelse, Denmark
Carlos T. Moraes, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, United States of America
Kei Murayama, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan
Jiri Neuzil, Griffith University, Griffith Health Institute, School of Medical Science, Nathan, Queensland, Australia
Paulo J. Oliveira, University of Coimbra Centre for Innovative Biomedicine and Biotechnology, Coimbra, Portugal
Oren Ostersefer-Biran, Hebrew University of Jerusalem The Alexander Silberman Institute of Life Sciences, Jerusalem, Israel
Debkumar Pain, New Jersey Medical School Department of Pharmacology and Physiology, Newark, New Jersey, United States of America
Sergio Papa, University of Bari Department of Bioscience Biotechnology and Biopharmaceutics, Bari, Italy
Mark Prescott, Monash University Department of Biochemistry and Molecular Biology, Clayton, Australia
Lene Juel Rasmussen, University of Copenhagen Department of Cellular and Molecular Medicine, København, Denmark
P. Hemachandra Reddy, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, Texas, United States of America
Rodrigue Rossignol, University of Bordeaux, Institute for Science and Medical Research, Bordeaux, France
Michael Sack, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America
Russell P. Saneto, Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington, United States of America
Shigeto Sato, Juntendo University School of Medicine Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan
Hiromi Sesaki, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America
Shey-Shing Sheu, Thomas Jefferson University Department of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America
Jan Smeitink, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Netherlands
Nadja de Souza-Pinto, University of Sao Paulo Department of Biochemistry, São Paulo, Brazil
Russell H. Swerdlow, University of Kansas School of Medicine, Kansas City, Kansas, United States of America
Csaba Szabo, University of Freiburg Faculty of Medicine, Freiburg, Germany
Mark Tarnopolsky, McMaster University Institute for Research on Aging, Hamilton, Ontario, Canada
Kumarasamy Thangaraj, Centre for Cellular and Molecular Biology CSIR, Hyderabad, India
David R. Thorburn, Murdoch Children's Research Institute Brain & Mitochondrial Research Group, Parkville, Australia
Douglas C. Wallace, The Children's Hospital of Philadelphia Center of Mitochondrial and Epigenomic Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America
Fanyan Wei, Tohoku University, Sendai, Japan
Yau-Huei Wei, Changhua Christian Hospital, Changhua, Taiwan
A. Phillip West, Texas A&M University College of Medicine, Bryan, Texas, United States of America
Shuichi Yatsuga, Fukuoka University, Fukuoka, Japan
Matthew Young, Southern Illinois University School of Medicine Carbondale, Carbondale, Illinois, United States of America
Boris Zhivotovsky, Karolinska Institute Institute of Environmental Medicine, Stockholm, Sweden

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Mitochondrion is a definitive, high profile, peer-reviewed international research journal. The scope of *Mitochondrion* is broad, reporting on basic science of mitochondria from all organisms and from basic research to pathology and clinical aspects of mitochondrial diseases. The journal welcomes original contributions from investigators working in diverse sub-disciplines such as evolution, biophysics, biochemistry, molecular and cell biology, genetics, pharmacology, toxicology, forensic science, programmed cell death, aging, cancer and clinical features of mitochondrial diseases.

Types of paper

Original Articles

Peer-reviewed, high-quality, concise research investigations that represent new and significant contributions to science.

Fast Track Articles

Peer-reviewed, short studies that are refereed rapidly and published generally within 10 weeks. These papers should be a concise complete piece of work of special significance and timeliness and should not exceed 4 printed pages (i.e., 1300 words including introduction and 4 tables/figures but excluding references). Fast Track Articles should be submitted under Short Communication article type in the submission system.

Review Articles

Reviews of major importance in mitochondrial biology. These articles will be peer-reviewed. Articles may be of any length; however, unusually long articles should be discussed with the editor before submission.

MitoMatters

Editorial and news of general interest invited by Editorial Office. Profiles and Perspectives: Invited by Editorial Office and written by senior investigators in the field.

The Mito Mew

Editorial and news of general interest.

Letters to the Editor

Comments on papers published in the Journal and on other matters of interest to mitochondria researchers. These should be less than 400 words and may include one illustration or table.

Book Reviews

Invited by the editorial office.

Announcements and Calendar

Providing notices of forthcoming meetings, courses, and other events relevant to mitochondria researchers.

Contact details for submission

Please submit manuscripts intended for *Mitochondrion* via the journal's online editorial and submission system available at <https://www.editorialmanager.com/mitoch/default.aspx>.

Customer support is available 24/7:

Please use our help site at: <https://service.elsevier.com/>. Here you will be able to learn more about Editorial Manager via interactive tutorials, explore a range of online submission solutions via our knowledgebase, and find answers to frequently asked questions. You will also find our 24/7 support contact details should you need any assistance from one of our customer service representatives.

For questions regarding the reviewing process, please contact the Editor-in-Chief, Dr. Keshav K. Singh at mitochondriona@roswellpark.org or at

Keshav K. Singh, Ph.D Department of Cancer Genetics Roswell Park Cancer Institute Cell and Virus Building, Room 247 Elm and Carlton Streets Buffalo, NY 14263 USA

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Policy and ethics

When conducting scientific research using human tissue and which is intended for publication in Mitochondrion, authors should follow procedures that are in accordance with the ethical standards as formulated in the Helsinki Declaration of 1975 (revised 1983). When conducting experiments on animals, authors should adhere to the local or national requirements for the care and use of laboratory animals.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see ['Multiple, redundant or concurrent publication'](#) for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and telephone, fax and e-mail details (where possible) of five suitable, potential reviewers. If there are compelling reasons for excluding some individuals as potential reviewers, these may be mentioned. However, the ultimate reviewer selection is at the discretion of the Editor-in-Chief.

Additional Information

After final acceptance of an article, only corrections to the title and list of authors as they appear on the accepted article will be permitted, not changes; particularly, no author names may be added to or deleted from the accepted lists.

The Editor-in-Chief is responsible for the professional review of the manuscripts. Receipt of manuscripts by the Editor-in-Chief will be acknowledged.

All materials submitted become the property of *Mitochondrion*. In the case of rejection of a paper, manuscripts will not be returned to authors.

Mitochondrion is the Official Journal of the Mitochondria Research Society. The journal is included as a part of the annual subscription to the society. Information regarding the society can be obtained from The Mitochondria Research Society, P.O. Box 306, Riderwood, MD 21139-0306, USA or visit the society's web site at <http://www.mitoresearch.org>.

PREPARATION**Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract should not exceed **100** words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>