

TRANSPLANTE MITOCONDRIAL: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E APLICAÇÕES CLÍNICAS DA MITOTERAPIA

Data de submissão: 07/04/2023

Data de aceite: 02/05/2023

Pedro Augusto Chikoski Albrecht

Laboratório de Bioquímica Celular,
Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
<https://lattes.cnpq.br/1088583647100647>

Antônio Galina

Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo
de Meis, Universidade Federal do Rio de
Janeiro (UFRJ)
Rio de Janeiro – Rio de Janeiro
<http://lattes.cnpq.br/8940530306495736>

Fábio Klamt

Laboratório de Bioquímica Celular,
Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/3256932358053453>

RESUMO: A mitoterapia (transplante de mitocôndrias) é uma técnica recente que busca, através da administração de mitocôndrias funcionais isoladas, reverter disfunções celulares em uma variedade de condições patológicas em tecidos - como isquemias pulmonar, cardíaca e cerebral,

doença de Parkinson, esquizofrenia e declínio cognitivo. Sua abordagem terapêutica diferencia-se da tradicional aplicação observada no uso de fármacos ou moléculas redox-sensíveis direcionadas para a população de mitocôndrias do órgão afetado. Em modelos celulares, animais e humanos, a mitoterapia já demonstrou potencial de recuperação do perfil metabólico, reversão do estresse celular e de danos teciduais. No entanto, diversos são os parâmetros ainda não padronizados que limitam o aprimoramento da técnica quanto à sua otimização e reprodutibilidade, e dificultam a sua ampla aplicação clínica. Neste capítulo exploramos os aspectos tecnológicos do transplante de mitocôndrias. Discutimos os resultados já obtidos e os desafios da implementação de uma técnica de caráter incipiente que apresenta grande diversidade de modelos celulares utilizados e variabilidade nos métodos empregados. A mitoterapia carece de técnicas padronizadas que garantam com satisfatória reprodutibilidade e robustez a demonstração de seus potenciais benefícios terapêuticos. Ainda assim, o transplante de mitocôndrias permanece sendo uma possibilidade promissora para o tratamento de diversas condições patológicas.

PALAVRAS-CHAVE: transplante mitocondrial; mitoterapia; disfunção mitocondrial; opção terapêutica.

MITOCHONDRIAL TRANSPLANTATION: TECHNOLOGICAL ASPECTS AND CLINICAL APPLICATION OF MITOTHERAPY

ABSTRACT: Mitotherapy (mitochondrial transplant) is a recent technique that seeks, through the administration of isolated functional mitochondria, to reverse cellular dysfunctions in a variety of pathological conditions - such as pulmonary, cardiac and cerebral ischemia, Parkinson's disease, schizophrenia and cognitive decline. Its therapeutic approach differs from the traditional application observed in the use of drugs or redox-sensitive molecules directed to the mitochondrial population of the affected organ. In cellular, animal and human models, this strategy has already demonstrated potential for recovery of the metabolic profile, reversal of cellular stress and tissue damage. However, there are several parameters that have not yet been standardized, which limit the improvement of the technique in terms of its optimization and reproducibility, and hinder its wide clinical application. In this chapter we explore the technological aspects of mitochondria transplantation. We discuss the results already obtained and the challenges of implementing an incipient technique that presents a great diversity of cell models and variability in the methods. Mitotherapy lacks standardized techniques that guarantee satisfactory reproducibility and robustness in demonstrating its potential therapeutic benefits. Still, mitochondria transplantation remains a potential possibility for the treatment of several pathological conditions.

KEYWORDS: Mitochondrial transplant; mitotherapy; mitochondrial dysfunction; therapeutic option.

1 | INTRODUÇÃO

Mitocôndrias são organelas de origem proteobacteriana essenciais para a vida (SCHWARTZ; DAYHOFF, 1978). Dentre suas funções mais proeminentes 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), parte do ciclo da uréia, e a indução da morte celular programada, ou apoptose (LI; DEWSON, 2015). Considerando seu papel nas demandas metabólicas e de sinalização na célula, as disfunções mitocondriais - com morfologia anormal (CATALDO *et al.*, 2010), defeitos na bioenergética (TREVINO *et al.*, 2019), na dinâmica mitocondrial (WANG *et al.*, 2009) e acúmulo de mutações no mtDNA (STENTON; PROKISCH, 2020) - podem resultar em diversas condições patológicas, como deficiências imunológicas (GARONE; TADESSE; HIRANO, 2011), hepáticas (HELBLING *et al.*, 2013), cardiomiopatias (SEBASTIANI *et al.*, 2007), declínio cognitivo (KUJOTH *et al.*, 2005) e estarem envolvidas com sintomas psiquiátricos (CATALDO *et al.*, 2010).

O surgimento, a algumas décadas, da possibilidade de transplante de mitocôndrias funcionais despertou grande interesse no meio científico. Seu princípio terapêutico,

fundamentado na reversão e recuperação da homeostasia mitocondrial, continua sendo uma promissora alternativa terapêutica para o amplo espectro de doenças e traumas que apresentam danos mitocondriais. Diversos foram os trabalhos animadores utilizando o transplante de mitocôndrias *in vitro* e *in vivo* com animais e humanos, principalmente em modelos de dano agudo pulmonar, cardiomiopatias e isquemias cardíacas, doença de Parkinson, câncer e técnicas de fertilização *in vitro*. Ainda assim, pouco avanço foi observado quanto à translação desses benefícios para o âmbito da clínica. Suas dificuldades de otimização são um reflexo do seu caráter incipiente, que carece de métodos e parâmetros padronizados que promovam com a robustez necessária uma técnica confiável e reprodutível. Parte dessa aparente falta de robustez se deve ao atual estado da arte que foca na validação de uma prova de conceito deste procedimento em diversos aspectos dos diferentes modelos de patologias e disfunções celulares. Este capítulo discutirá as possibilidades e desafios do transplante de mitocôndrias. Serão abordadas variáveis metodológicas da mitoterapia, como protocolos de isolamento mitocondrial, tipo de transplante e métodos de medição da terapia, e as necessidades de seu aprimoramento para a implementação clínica da técnica.

2 | TRANSPLANTE DE MITOCÔNDRIAS

A mitoterapia (transplante de mitocôndrias) 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 pré-clínicos (*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 direta do meio extracelular, 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, reportaram a internalização de mitocôndrias de roedor por linhagens de células cancerígenas, resultando em recuperação das taxas respiratórias em 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 a hiper-sensitividade e isquemia pulmonar (SU, *et al.*, 2016; MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020), as cardiopatias e isquemias cardíacas (EMANI *et al.*, 2017; DOULAMIS *et al.*, 2020), a nefropatia diabética e nefrotoxicidade (KONARI *et al.*, 2019; ARJMAND *et al.*, 2022), o dano hepático e carcinoma hepatocelular (ZHAO *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2022), as disfunções ópticas (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; AHARONI-SIMON

et al., 2022), o dano neuromuscular periférico e isquemia de membro (ORFANY *et al.*, 2020; ALWAY *et al.*, 2023), tendinopatias (LEE J. *et al.*, 2021), osteoartrite (LEE A. *et al.*, 2022), sepse (ZHANG *et al.*, 2021), reparação de feridas (KIM *et al.*, 2022) e técnicas de fertilização *in vitro* (OKTAY *et al.*, 2015; LABARTA *et al.*, 2019). Mais especificamente na área de patologias neurais a mitoterapia já foi usada em estudos de isquemia (XIE *et al.*, 2021), trauma (ZHANG *et al.*, 2020) e tumor cerebral (SUN *et al.*, 2019), doença de Parkinson (CHANG *et al.*, 2021), lesão da medula espinhal (GOLLIHUE *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2022), doença de Alzheimer (NITZAN *et al.*, 2019), esquizofrenia (ROBICSEK *et al.*, 2018), epilepsia (JIA *et al.*, 2022), depressão e ansiedade (JAVANI *et al.*, 2022), e declínio cognitivo (MA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021) (Figura 1).

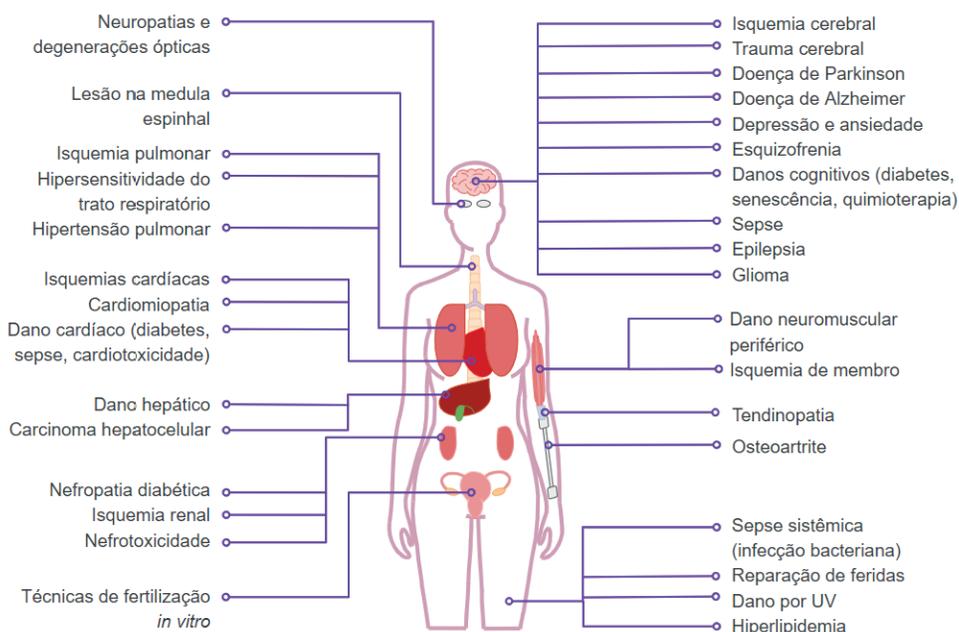


Figura 1 – Principais condições patológicas em estudos de transplante de mitocôndrias. Os exemplos incluem o uso de modelos *in vitro* e *in vivo* (com animais ou humanos).

3 | EFEITOS TERAPÊUTICOS DO TRANSPLANTE DE MITOCÔNDRIAS

Apesar da mitoterapia se apresentar como uma vantajosa possibilidade terapêutica para um vasto número de doenças e traumas, ainda não se conhece de forma satisfatória os mecanismos pelos quais mitocôndrias saudáveis transplantadas exercem seus efeitos terapêuticos e, tampouco, como são controladas suas vias de internalização celular. De forma geral, a administração dessas organelas resulta na reversão total ou parcial do desequilíbrio metabólico, com suprimento das necessidades energéticas (ROBICSEK *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2021), recuperação da integridade celular e tecidual (EMANI *et al.*,

2017; ALEXANDER *et al.*, 2021), aprimoramento da morfologia mitocondrial (CHANG *et al.*, 2017), diminuição do estresse oxidativo (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 (ROBICSEK *et al.*, 2018; KONARI *et al.*, 2019), alterações de expressão gênica (ALEXANDER *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2021), diminuição da morte celular (COWAN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021) e redução da inflamação (ALEXANDER *et al.*, 2021; CHANG *et al.*, 2021) (Figura 2).

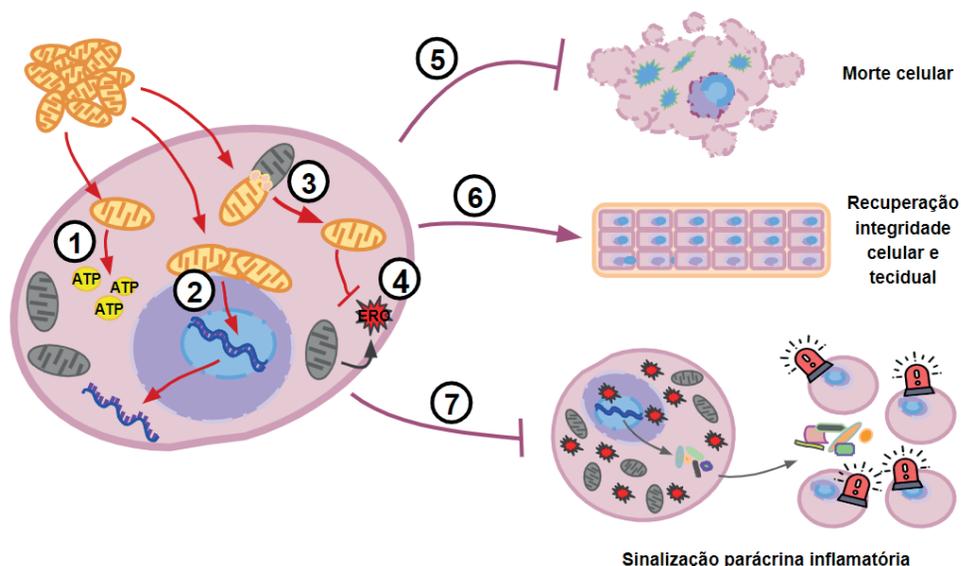


Figura 2 – Principais efeitos intercelulares do transplante de mitocôndrias exógenas. A administração de mitocôndrias exógenas funcionais resulta em: (1) melhora energética; (2) modulação da expressão gênica e sinalização intracelular; (3) fusão das mitocôndrias exógenas com as hospedeiras defeituosas, recuperando a função mitocondrial e a capacidade de tamponamento de cálcio; (4) diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO); (5) redução da morte celular; (6) recuperação da integridade celular e tecidual e (7) inibição da sinalização parácrina inflamatória.

Certos estudos indicam que tais benefícios ocorrem através da reparação da maquinaria bioenergética, possivelmente se fusionando com mitocôndrias hospedeiras (COWAN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021). Outros estudos, observando sua localização perinuclear e as baixas taxas de internalização, sugerem que os benefícios atribuídos às mitocôndrias exógenas se encontram na alteração de mecanismos de sinalização e expressão gênica (ALEXANDER *et al.*, 2021; SHI; GUO; LIU, 2021). O mais provável é que os efeitos terapêuticos observados sejam resultado da combinação de diversos mecanismos.

4 | POTENCIAIS RISCOS

Embora a mitoterapia esteja se mostrando bastante promissora, sua aplicação pode não ser livre de riscos. Dentre as questões mais ressaltadas está o papel das mitocôndrias como fonte de DAMP's (do inglês, *damage-associated molecular patterns*), atuando como mediadores do processo inflamatório quando, no meio extracelular, seus componentes são reconhecidos por receptores específicos em células do sistema imune ou outros tipos celulares (JOSHI *et al*, 2019). Concordando com tais preocupações, certos estudos relataram indícios de resposta inflamatória (GOLLIHUE *et al.*, 2018; CHANG *et al*, 2021). Foi reportado aumento na ativação de macrófagos no local da medula espinhal danificada de ratos onde as mitocôndrias foram injetadas (GOLLIHUE *et al.*, 2018), resposta imune inata (com atração de macrófagos e microglia) após a injeção de mitocôndrias em modelo ratos isquêmicos (HUANG *et al.*, 2016), e resposta inflamatória (com liberação de IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-17A) após a infusão intranasal de mitocôndrias em ratos modelos para parkinsonismo (CHANG *et al*, 2021). Em contrapartida, outros artigos apontam para a segurança da técnica (SHIN *et al.*, 2019), não identificando 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; LIN *et al*, 2022). O transplante de mitocôndrias de músculo de ratos em 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 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).

5 | 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 dos resultados. Outra característica que contribui para essa variabilidade é o próprio princípio do racional terapêutico que propõe o transplante de um material biológico (organelas celulares isoladas) contrastando com o processo de desenvolvimento de fármacos - onde se padroniza com maior facilidade as condições de produção, controle de qualidade e estabilidade do produto que estará disponível para o benefício do paciente. Para o manuseio e administração das mitocôndrias devem-se considerar todas as possíveis particularidades naturais de um ser vivo, com um perfil biológico intrínseco também influenciado por fatores extrínsecos. 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, que dificultam a padronização de parâmetros e métodos que aumentariam a segurança e eficiência da técnica. Os aspectos tecnológicos que necessitam de padronização incluem o método de isolamento, a dose terapêutica, o veículo e via de administração, a duração do tratamento, o tipo de transplante e tecido-fonte de mitocôndrias e métodos de avaliação do efeito terapêutico (Figura 3).

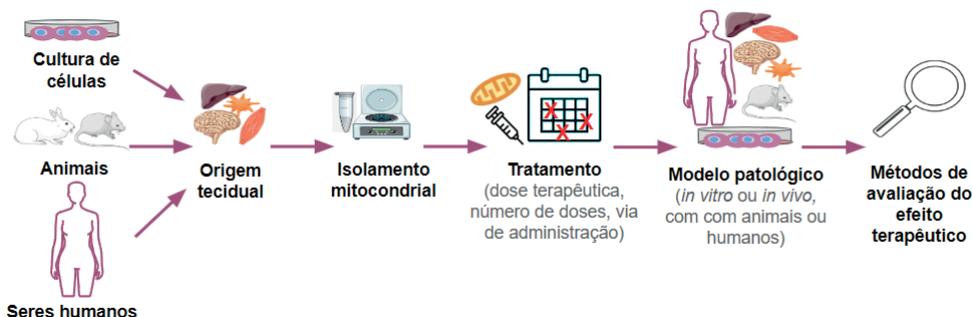


Figura 3 – Aspectos importantes a serem padronizados no aprimoramento da mitoterapia. As variáveis em que os estudos de mitoterapia se deparam incluem: a fonte de mitocôndrias (cultura de células, animais ou seres humanos) e o tipo tecidual; o protocolo de isolamento de mitocôndrias; especificidades do tratamento como dose terapêutica, número de doses e via de administração; o modelo patológico e os métodos de avaliação do efeito terapêutico após o tratamento.

5.1 Transplantes autólogos, alogênicos e xenogênicos

Inúmeros são as fontes de tecidos e tipos celulares, *in vitro* e *in vivo*, que já foram usados para o isolamento de mitocôndrias visando a mitoterapia. *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; CHANG *et al.*, 2021) e músculo esquelético (BLITZER *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 reconhecimento e rejeição pelo sistema imune (SUN *et al.*, 2019; EMANI *et al.*, 2017). Estudos utilizando mitocôndrias alogênicas - provenientes de organismos da mesma espécie - também apresentaram resultados promissores (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 (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 pouco ou nenhum dano relacionado (SHI *et al.*, 2017; NASCIMENTO-DOS-SANTOS, 2020). Um grande benefício da estratégia xenogênica para estudos mitoterápicos 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).

5.2 Taxa de internalização

A internalização de mitocôndrias, ainda que não completamente elucidada, 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). Os principais mecanismos candidatos são a endocitose (KATRANGI *et al.*, 2007) mediada pelas proteínas clatrina e dinamina (PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021) ou por actina e macropinocitose (KITANI *et al.*, 2014). Diferentes tipos celulares possuem perfis de expressão da maquinaria endocítica próprios, que refletem em diferentes tempos de incubação das mitocôndrias com as células para a obtenção do efeito terapêutico. Por exemplo, no sistema nervoso as taxas de internalização de mitocôndrias são cerca de 40-50% em neurônios e astrócitos, 0-10% em oligodendrócitos e 70% em micróglias, refletindo a função de cada tipo celular (ZHAO, *et al.*, 2021). Já mitocôndrias provenientes de músculo esquelético ou cardíaco costumam apresentar semelhantes taxas de internalização (WEIXLER *et al.*, 2020). Alguns trabalhos reportaram baixas taxas de internalização de mitocôndrias exógenas, com variações de eficácias de 3-15% (MA *et al.*, 2020; SHI; GUO; LIU, 2021), 15-30% (KITANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016) e 50% (ROBICSEK *et al.*, 2018). Um fator que pode aumentar a taxa de internalização é o estresse celular das células receptoras (BABENKO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019). Ainda assim, outros afirmam que não encontraram tal associação (HUANG *et al.*, 2016; SHI; GUO; LIU, 2021). De forma geral, injeções intravenosas costumam apresentar boa distribuição sistêmica de internalização de mitocôndrias (SHI *et al.*, 2017), e injeções locais costumam demonstrar satisfatória concentração das organelas no local danificado (GUARIENTO *et al.*, 2020). Diversos estudos também testaram estratégias para aumentar a internalização de mitocôndrias e direcioná-las para o local desejado (BABENKO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2023), ligando-as à polipeptídeos da família dos penetradores de células, como Pep-1 (CHANG *et al.*, 2021), ao polímero dextran conjugado com TAT (MAEDA *et al.*, 2020) ou TPP (WU *et al.*, 2018), ou através de centrifugação (KIM *et al.*, 2018),

5.3 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). O isolamento de tecidos inicia na separação das células com a lise mecânica e utilização da tripsina (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2021). O isolamento de mitocôndrias a partir de células em cultura inicia com o destacamento das células - com tripsina (SHI *et al.*, 2017; KONARI *et al.*, 2019) ou raspadores mecânicos (GOLLIHUE *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Apesar da tripsina garantir maior rendimento, seus resíduos, potencialmente danosos, foram encontrados no pellet mitocondrial (GOLLIHUE *et al.*, 2017). De forma geral, ocorrem centrifugações com variação na velocidade para obter purificações seriadas, intercaladas pela lise celular mecânica (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* (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 (isotônica) adicionando tampão hipertônico (PATEL *et al.*, 2017; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021). Para aumentar a purificação, alguns artigos fazem lise em câmara de N₂ (GOLLIHUE *et al.*, 2017), filtram o isolado (COWAN *et al.*, 2016; 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). Depois do processo de isolamento, para evitar perdas na viabilidade, as organelas podem ser mantidas em gelo por até 3-4 horas (PATEL *et al.*, 2017; BLITZER *et al.*, 2020). Ainda assim, alguns estudos testaram com sucesso mitocôndrias armazenadas, em solução baseada em aminoácidos, por até 3 dias (LIN *et al.*, 2023), ou até 1 ano, congeladas em - 80 °C. Estas últimas, quando comparadas com mitocôndrias frescas apresentaram semelhantes morfologias e capacidades funcionais (CLOER *et al.*, 2023). O estabelecimento de um método adequado de armazenamento de mitocôndrias é fundamental para o suporte clínico. 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). É fundamental, após a escolha do método e padronização/otimização desse, considerar não só a quantidade de mitocôndrias isoladas, mas também a sua qualidade determinada pela avaliação da sua taxa respiratória (GOLLIHUE *et al.*, 2017).

5.4 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 (CHANG *et al.*, 2017; ROBICSEK *et al.*, 2018), imunohistoquímica (ZHOU *et al.*, 2016; 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; 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 (SHI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018), ROS (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 por sondas fluorescentes (com equipamentos como *Seahorse™*) (SUN *et al.*, 2019), métodos polarográficos específicos para detecção de oxigênio como o eletrodo de Clark (*Clark Oxygen Electrode*) (ROBICSEK *et al.*, 2018) e seu aprimoramento em alta resolução (*Oroboros™*) (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al.*, 2020; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021). 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 independentes ou dependentes de voltagem, como o JC-1 (iodeto 15 de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (SUN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020), que pode indicar o potencial de membrana mitocondrial (ROBICSEK *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2021). Ainda, podem ser utilizados marcadores transgênicos (KONARI *et al.*, 2019; MAEDA *et al.*, 2020), fluorescentes (HUANG *et al.*, 2016; 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 (KIM *et al.*, 2018; SHI; GUO; LIU, 2021).

6 | CONCLUSÃO

A discussão das estratégias, do racional terapêutico e dos desafios no estudo da mitoterapia é fundamental para a identificação das necessidades de aprimoramento da técnica. Os aspectos metodológicos que impactam na capacidade de reversão do estresse celular incluem dose mitocondrial e duração da terapia, tipo de transplante, tecido-fonte de organelas, e métodos de avaliação terapêutica. Ainda, a questão das mitocôndrias serem um material terapêutico biológico dificulta os processos de preservação e armazenamento até a sua aplicação. Desse modo, o desenvolvimento de estratégias de conservação da viabilidade mitocondrial, como congelamento ou liofilização, poderá impactar positivamente na utilização em ampla escala da mitoterapia. Tais variáveis influenciam a confiabilidade e reprodutibilidade, e dificultam a obtenção de resultados robustos que viabilizarão com maior

eficiência a translação clínica do transplante de mitocôndrias. Mais estudos são necessários para garantir a padronização e análise comparativa dos métodos. A mitoterapia continua sendo uma estratégia promissora para o tratamento de diversas condições patológicas, resta, porém, saber quando e se essa promessa conseguirá trazer benefícios reais para os pacientes humanos.

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.

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.

ALWAY, S. E., *et al.* Mitochondria transplant therapy improves regeneration and restoration of injured skeletal muscle. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**. 14(1), 493–507. 2023.

ARJMAND, A., *et al.* Mitochondrial transplantation against gentamicin-induced toxicity on rat renal proximal tubular cells: the higher activity of female rat mitochondria. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, 59(1), 31–40. 2023.

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.

BLITZER, D., *et al.* Delayed Transplantation of Autologous Mitochondria for Cardioprotection in a Porcine Model. **Ann Thorac Surg**, vol. 109,3 (2020): 711-719.

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.

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.

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.

CLARK, M. A.; SHAY, J. W. Mitochondrial transformation of mammalian cells. **Nature**, [s. l.], v. 295, n. 5850, p. 605–607, 1982.

CLOER, C. M., *et al.* Mitochondrial transplant after ischemia reperfusion promotes cellular salvage and improves lung function during ex-vivo lung perfusion. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, S1053-2498(23)00002-5. 2023.

COWAN, D. B. *et al.* Intracoronary Delivery of Mitochondria to the Ischemic Heart for Cardioprotection. **PLOS ONE**, [s. l.], p. 19, 2016.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**. Vol. 822, Issue 1, 1-42, 1985.

DOULAMIS, I. P., *et al.* Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts. **European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery**. 57(5), 836–845. 2020.

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.

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.

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.

GOLLIHUE, J. L. *et al.* Optimization of Mitochondrial Isolation Techniques for Intraspinal Transplantation Procedures. **Journal of neuroscience methods** vol. 287 (2017): 1-12.

GUARIENTO, A., *et al.* Mitochondrial transplantation for myocardial protection in ex-situ-perfused hearts donated after circulatory death. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, 39(11), 1279–1288. 2020.

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.

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.

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.

JAVANI, G., *et al.* Mitochondrial transplantation improves anxiety- and depression-like behaviors in aged stress-exposed rats. **Mechanisms of ageing and development**. 202, 111632. 2022.

JIA, X., *et al.* Mitochondrial transplantation ameliorates hippocampal damage following status epilepticus. **Animal models and experimental medicine**. 6(1), 41–50. 2023.

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.

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.

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.

KATRANGI, E. *et al.* Xenogenic Transfer of Isolated Murine Mitochondria into Human p⁰ Cells Can Improve Respiratory Function. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 561–570, 2007.

KIM, M.J. *et al.* Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 13, 2018.

KIM, S., *et al.* Platelet-derived mitochondria transfer facilitates wound-closure by modulating ROS levels in dermal fibroblasts. **Platelets**. 34(1), 2151996. 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.

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.

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.

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.

LEE, J.M., *et al.* Mitochondrial Transplantation Modulates Inflammation and Apoptosis, Alleviating Tendinopathy Both In Vivo and In Vitro. **Antioxidants**. 10, 696. 2021.

LEE, A. R., *et al.* Mitochondrial Transplantation Ameliorates the Development and Progression of Osteoarthritis. **Immune network**. 22(2), e14. 2022.

LI, MX., DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000Prime Reports**. vol. 7 42. 1 Apr. 2015.

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.

LIN, Z. J., *et al.* Human platelet mitochondria improve the mitochondrial and cardiac function of donor heart. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, 475(2), 267–275. 2023

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.

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.

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.

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.

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.

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.

NITZAN, K., *et al.* Mitochondrial Transfer Ameliorates Cognitive Deficits, Neuronal Loss, and Gliosis in Alzheimer's Disease Mice. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, 72(2), 587–604. 2019.

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.

ORFANY, A., *et al.* Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia. **Journal of vascular surgery**. 71(3), 1014–1026. 2020.

PAMENTER, ME., LAU, GY., RICHARDS, JG. Effects of cold on murine brain mitochondrial function. **PloS one**. Vol. 31,12 e0208453. 6 Dec. 2018.

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.

PERUZZOTTI-JAMETTI, L. *et al.* Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. **PLOS BIOLOGY**. vol. 19,4 e3001166. 7 Apr. 2021.

RAMIREZ-BARBIERI, G. *et al.* Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. **Mitochondrion**. vol. 46 (2019): 103-115.

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.

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.

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.

- SHI, X., *et al.* Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. **Mitochondrion** vol. 34 (2017): 91-100.
- 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.
- SHIN, B., *et al.* A Novel Biological Strategy for Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy. **JACC. Basic to translational science**, 4(8), 871–888. 2019.
- STENTON, SL., PROKISCH, H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. **EBioMedicine**. vol. 56 (2020): 102784.
- SU, Y., *et al.* Mitochondrial Transplantation Attenuates Airway Hyperresponsiveness by Inhibition of Cholinergic Hyperactivity. **Theranostics**. 6(8), 1244–1260. 2016.
- 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.
- SUN, X., *et al.* Intravenous Transplantation of an Ischemic-specific Peptide-TPP-mitochondrial Compound Alleviates Myocardial Ischemic Reperfusion Injury. **ACS nano**, 17(2), 896–909. 2023.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- WEIXLER, V., *et al.* Autogenous mitochondria transplantation for treatment of right heart failure. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, 162(1), e111–e121. 2021.
- 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.
- 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.

ZHANG, Z., *et al.* Muscle-Derived Mitochondrial Transplantation Reduces Inflammation, Enhances Bacterial Clearance, and Improves Survival in Sepsis. **Shock** (*Augusta, Ga.*), 56(1), 108–118. 2021.

ZHAO, Z., *et al.* Mitochondrial transplantation therapy inhibit carbon tetrachloride-induced liver injury through scavenging free radicals and protecting hepatocytes. **Bioengineering & translational medicine**. 6(2), e10209. 2020.

ZHAO, J., *et al.* Mitochondria transplantation protects traumatic brain injury via promoting neuronal survival and astrocytic BDNF. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, 235, 102–114. 2021.

ZHOU, J. *et al.* Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Oncotarget**. 2016 May 24;7(21):31284-98.

ZHOU, W., *et al.* Mitochondrial transplantation therapy inhibits the proliferation of malignant hepatocellular carcinoma and its mechanism. **Mitochondrion**. 65, 11–22. 2022.