

Impacto da preservação e criopreservação de tecido cardíaco na funcionalidade mitocondrial ao longo do tempo

Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2º ciclo em Atividade Física e Saúde, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, ao abrigo do Decreto-Lei nº 74/2006, de 24 de março, na redação dada pelo Decreto-Lei nº 65/2018 de 16 de agosto.

Orientador: Prof. Doutor José Fernando Magalhães Pinto Pereira

Coorientadora: Prof.^a Doutora Inês Falcão Pires

Rafael Eduardo Ferreira Merêncio

Porto, 2024

FICHA DE CATALOGAÇÃO

Merêncio, R. (2024). Impacto da preservação e criopreservação de tecido cardíaco na funcionalidade mitocondrial ao longo do tempo. Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2.º ciclo em Atividade Física e Saúde, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Palavras-chave: Mitocôndrias, Custodiol, Hypothermosol, Músculo Cardíaco, MyoDish, Living Myocardial Slices (LMS), OROBOROS.



Suporte financeiro

A presente dissertação de Mestrado foi realizada no Centro de Investigação em Atividade Física, Saúde e Lazer (CIAFEL) da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto (FADE/UP) em colaboração com o UnIC@RISE, Departamento de Cirurgia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. O CIAFEL é financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT; UID/DTP/00617/2020) e é membro do Laboratório para a Investigação Integrativa e Translacional em Saúde da População (ITR; LA/P/0064/2020).



Fundação
para a Ciência
e a Tecnologia

Dedicatória

Ao Professor José Magalhães, cuja trajetória e dedicação à ciência são uma fonte constante de inspiração. O seu exemplo de rigor académico e profissionalismo foram certamente estimulantes para o meu desenvolvimento enquanto estudante. A voz da experiência é inestimável, e embora por vezes diga *“Rafael, tens de me dar um desconto, já é a idade”*, o professor é a prova viva de que, quando somos abertos ao conhecimento e temos o espírito de aprendizagem que possuí, nunca envelhecemos; somos como o vinho do Porto, com o tempo, só melhora. Sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de aprender consigo e por todo o apoio que me proporcionou ao longo deste percurso.

À doutoranda Inês Alves, cuja presença foi preciosa ao longo de todo o projeto. Inês, sem dúvida que o teu apoio constante e a tua dedicação incansável foram essenciais para que eu pudesse superar cada desafio desta jornada. A tua paixão pelo conhecimento e a tua habilidade em transmiti-lo com clareza e entusiasmo foram aspetos inspiradores para mim. Não tenho dúvidas de que, sem ti, este trabalho não teria sido possível, e com certeza este percurso não teria a mesma riqueza de aprendizagem que teve, numa área que sempre me entusiasmou, mas na qual nunca tinha tido a oportunidade de trabalhar, tu ensinaste-me como deveria dar os primeiros passos. Hoje sinto-me muito realizado por todo este percurso e por ter conectado com pessoas cheias de conhecimento e sempre dispostas a ajudar, ansioso por poder desenvolver mais trabalhos neste sentido. O meu profundo agradecimento por tudo, e principalmente por me contagiares com a tua paixão pela excelência.

Sem dúvida, não poderia ter tido melhores profissionais e, acima de tudo, pessoas para me acompanhar neste projeto... Muito Obrigado!

Finalmente, quero dedicar este trabalho à minha Mãe, pelo seu apoio constante, inspiração diária e acima de tudo o seu amor incondicional!

Agradecimentos

É importante ressaltar que este trabalho não seria possível sem a colaboração de várias pessoas e instituições, às quais expresso a minha profunda gratidão:

- Às instituições envolvidas, tanto à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, como ao Departamento de Cirurgia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, que disponibilizou o laboratório onde foi conduzido todo o trabalho prático deste estudo, fundamental para a sua realização, assim como os dois Oroboros O₂k, cada um deles cedido por cada uma das faculdades, essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

- Ao meu orientador, Prof. Dr. José Magalhães, pela sua orientação e suporte ao longo de todo o ano; foi incansável, guiou-me em cada etapa deste processo. Assim como à minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Inês Falcão Pires, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, também merece um sentido agradecimento por sua valiosa contribuição.

- Um agradecimento especial à doutoranda, Inês Alves, que acompanhou praticamente toda a investigação, oferecendo uma ajuda indiscutível em várias fases do estudo. A Prof.^a Dra. Marisa Oliveira merece igualmente o meu reconhecimento pela sua dedicação na gestão das LMS, garantindo que tudo estivesse em conformidade e a funcionar corretamente.

- À doutoranda Juliana Moraes, que foi responsável pelos sacrifícios dos animais, uma tarefa difícil, mas crucial para o avanço da investigação. O seu trabalho metódico e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste estudo.

- Por último, e ainda mais importante, quero agradecer aos meus pais e à minha irmã que são os meus pilares, e me dão todas as condições e motivação para que eu possa lutar pelo meu futuro, um profundo Obrigado!

Índice Geral

Dedicatória.....	V
Agradecimentos	VII
Índice de figuras.....	XI
Índice de tabelas	XII
Resumo	XIV
Abstract.....	XVI
Abreviaturas e símbolos.....	XVIII
1. Introdução.....	22
2. Revisão da Literatura.....	23
2.1 As Mitocôndrias no contexto da biologia celular	23
2.2. As mitocôndrias no contexto do exercício físico (biogénese e dinâmica mitocondrial)	27
2.3. As mitocôndrias no contexto da patologia	31
2.4. As mitocôndrias no contexto do exercício clínico: A sua utilização como estratégia não farmacológica preventiva e terapêutica	33
2.5. Problemas metodológicos associados à realização de protocolos de avaliação mitocondrial.....	35
2.6. Soluções e método de criopreservação.....	37
3. Considerações, objetivos e hipóteses do presente trabalho.....	39
4. Material e métodos.....	40
4.1. Caracterização e modelo do animal.....	40
4.2. Preparação do tecido	41
4.3. Soluções de preservação a curto prazo	42
4.3.1. Amostras mantidas no sistema MyoDish (<i>Living Myocardial Slices</i> – LMS)	42
4.3.2. Amostras preservadas com Custodiol e Hypothermosol	43
4.4. Criopreservação mitocondrial a longo prazo.....	43
4.5. Metodologia de permeabilização das fibras.....	44
4.6. Protocolo de avaliação da função mitocondrial em Oroboros O₂K .	44

4.7. Teste de integridade da membrana externa (citocromo c)	46
4.8. Análise estatística	47
5. Resultados	48
5.1. Amostras preservadas a curto prazo (CO e HT)	48
5.1.1. Amostras avaliadas 1 dia após a colheita a fresco	49
5.1.2. Amostras avaliadas 3 dias após a colheita	51
5.1.3. Amostras avaliadas 7 dias após colheita	54
5.2. Amostras mantidas no sistema MyoDish (<i>Living Myocardial Slices</i> - LMS)	58
5.3. Amostras em condições de criopreservação (longo prazo)	60
6. Discussão	64
6.1. Condições de preservação a curto prazo	65
6.2. Condições de criopreservação a longo prazo	68
6.3. Sugestões para trabalhos futuros	71
7. Conclusão	73
8. Bibliografia	75

Índice de figuras

Figura 1 - Processos mitocondriais de produção de energia (<i>adaptado de: Bian et al., (2020)</i>).....	27
Figura 2 - Regulação da biogénese mitocondrial (<i>adaptado de Quan et al., (2020)</i>).....	29
Figura 3 - Mecanismos de dinâmica e controlo de qualidade mitocondrial (<i>adaptado de: Garbern & Lee, (2021)</i>).....	30
Figura 4 - Linha temporal das avaliações das amostras..	46
Figura 5 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 1º dia de armazenamento.	50
Figura 6 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 3º dia de armazenamento.	52
Figura 7 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 7º dia de armazenamento.	55
Figura 8 - Respiração mitocondrial das LMS a fresco e 2 e 4 dias após armazenamento	59
Figura 9 - Respiração mitocondrial em amostras sujeitas a diferentes condições de criopreservação a longo prazo.	61

Índice de tabelas

<i>Tabela 1</i> - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) nas condições de curto prazo.....	57
<i>Tabela 2</i> - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) de amostras LMS.	60
<i>Tabela 3</i> - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) em diferentes condições de criopreservação a longo prazo.	63

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a função respiratória mitocondrial de frações de músculo cardíaco de ratos, armazenadas ao longo do tempo em diferentes tipos de soluções de preservação e criopreservação. Para o efeito, frações dos ventrículos esquerdos (VE) foram colhidas e avaliadas imediatamente, após 1, 3 e 7 dias de armazenamento em Custodiol (CO) e Hypothermosol (HT), na forma de fibras ou tecido, e após 1 e 2 meses em diferentes condições de criopreservação. Frações dos ventrículos direitos (VD) foram mantidas no sistema MyoDish e na forma de *Living Myocardial Slices* (LMS) e avaliadas a fresco e após 2 e 4 dias de armazenamento. A avaliação da funcionalidade mitocondrial foi realizada em Respirômetros de Alta Resolução (Oroboros O₂k) segundo o protocolo SUIT-014.

A preservação da funcionalidade respiratória mitocondrial associada ao complexo I em estado OXPHOS, até ao 3º dia, só foi garantida pelo CO a 4 °C. Quanto à funcionalidade mitocondrial do complexo II, o CO a 4 °C é a solução que melhor preserva amostras até ao 7º dia. Quanto à integridade da membrana externa mitocondrial, a metodologia mais eficaz foi a preservação das amostras na forma de LMS. A condição 1 foi a que se mostrou mais eficaz na criopreservação na funcionalidade mitocondrial do complexo I em estado OXPHOS até ao 1º mês, enquanto que relativamente ao complexo II todas as condições foram eficazes até ao 2º mês. Quanto à integridade da membrana externa mitocondrial, a condição 2 foi a que se mostrou mais eficaz.

Tendo em conta os resultados obtidos, a utilização de diferentes métodos de preservação e criopreservação, a curto e a longo prazo, deve ser criteriosamente elegida em função dos objetivos específicos relativos à funcionalidade respiratória mitocondrial.

Palavras-chave: Mitocôndrias, Custodiol, Hypothermosol, Músculo Cardíaco, MyoDish, Living Myocardial Slices (LMS), OROBOROS

Abstract

The present study aimed to evaluate the mitochondrial respiratory function of heart muscle fractions from mice, stored over time in different types of preservation and cryopreservation solutions and conditions. For this purpose, fractions of the left ventricles (LV) were collected and evaluated immediately, after 1, 3, and 7 days of storage in Custodiol (CO) and Hypothermosol (HT), either as fibers or tissue, and after 1 and 2 months under different cryopreservation conditions. Fractions of the right ventricles (RV) were stored in the MyoDish culture medium in the form of *Living Myocardial Slices* (LMS) and evaluated fresh and after 2 and 4 days of storage.

The evaluation of mitochondrial respiratory functionality was carried out in High-Resolution Respirometers (Oroboros O₂k) according to the SUIT-014 protocol.

Mitochondrial functionality associated with complex I in the OXPHOS state was only preserved by CO at 4 °C up to the 3rd day. Regarding mitochondrial functionality of complex II, CO at 4 °C was the solution that best preserved samples up to the 7th day. Concerning the integrity of the outer mitochondrial membrane, the most effective method was preserving the samples in the form of LMS. Condition 1 was the most effective for cryopreservation of mitochondrial functionality of complex I in the OXPHOS state up to the 1st month, while for complex II, all conditions were effective up to the 2nd month. However, and regarding the integrity of the outer mitochondrial membrane, condition 2 proved to be the most effective.

Considering the obtained results, the use of different preservation and cryopreservation methods, both short and long term, must be carefully chosen based on the specific objectives related to mitochondrial respiratory functionality.

Keywords: Mitochondria, Custodiol, Hypothermosol, Cardiac Muscle, MyoDish, Living Myocardial Slices (LMS), OROBOROS

Abreviaturas e símbolos

0d = fresco (0 dias)

ADP = Adenosina Difosfato

AKT = Proteína Quinase B

AMPK = Proteína Quinase Ativada por AMP

ATP = Adenosina Trifosfato

BHB = Beta-Hidroxibutirato

BIOPS = Solução de Perfusão Cardioplégica

BSA = Albumina de Soro Bovino

CAMK = Proteína Quinase Dependente de Cálcio

CCCP = Carbonil Cianeto M-Clorofenilhidrazona

CI = complexo I

CI+II = complexo I + complexo II

CII = complexo II

C1 = Condição 1

C2 = Condição 2

C3 = Condição 3

C4 = Condição 4

C5 = Condição 5

CO = Custodiol

CO4°C(f) = Custodiol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas em fibras

CO4°C(t) = Custodiol a 4 °C utilizado em amostras primeiramente armazenadas em tecido

COTa(f) = Custodiol a temperatura ambiente utilizado em amostras previamente armazenadas em fibras

COTa(t) = Custodiol a temperatura ambiente utilizado em amostras previamente armazenadas em tecido

CREB = Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta cAMP

CTE = Cadeia de Transporte de Eletrões

cyt c = citocromo c

DA = Doença de Alzheimer

DCV = Doenças Cardiovasculares

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

DNT = Doenças Não Transmissíveis

DRP1 = Proteína Relacionada com a Dinamina 1

DT2 = Diabetes Tipo 2

ERR α = Recetor Relacionado ao Estrogénio Alfa

ET = Respiração Não Acoplada

FADH₂ = Flavina Adenina Dinucleótido Hidrogenado

FBS = Soro Bovino Fetal

FIS1 = Proteína de Fissão 1

GM = “adição” dos substratos glutamato / malato

GMP = “adição” dos substratos / malato / piruvato

hASC = Culturas Confluentes de Células Estromais/Tronco Adiposo Humano

HT = Hypothermosol

HT4°C(f) = Hypothermosol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas em fibras

HT4°C(t) = Hypothermosol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas em tecido

LEAK = refere-se à respiração mitocondrial que ocorre quando o ATP não está a ser sintetizado

LMS = Living Myocardial Slices - Fatias de Miocárdio Vivas

MAMs = Membranas Associadas às Mitocôndrias

MEF2C = Miócitos 2C

MEF2D = Miócitos D

MFN1 = Mitofusina-1

MFN2 = Mitofusina-2

MiR = Meio de Respiração Mitocondrial

MME = Membrana Mitochondrial Externa

MMI = Membrana Mitochondrial Interna

mTOR = “Mammalian Target of Rapamycin” - Alvo da Rapamicina em Mamíferos

mtOm = Mitochondrial Outer Membrane - Membrana Externa Mitochondrial

N₂ = Azoto

NADH = Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto

NRF1 = Fator Respiratório Nuclear 1

NRF2 = Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado

OPA = Proteína Associada à Opacidade

OPA1 = Proteína Óptica Atrofia 1

OXPHOS = Fosforilação Oxidativa do Sistema Mitocondrial

PGC-1 α = Coativador 1-Alfa do Recetor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
Gama

PINK1 = PTEN-Induced Kinase 1

p38 MAPK = Proteína Quinase Ativada por Mitógenos p38

PO₂ = Pressão de Oxigénio

RM = Respiração Máxima

ROX = Consumo Residual de Oxigénio

ROS = Espécies Reativas de Oxigénio

SIRT = Sirtuínas

SIRT1 = Sirtuína 1

SUIT = Substrato-Desacoplador-Inibidor

Ta = Temperatura Ambiente

TFAM = Fator de Transcrição Mitocondrial A

VE = Ventrículo Esquerdo

VD = Ventrículo Direito

vs = versus

1. Introdução

Ao longo dos anos, o papel das mitocôndrias na biologia celular e na saúde humana tem sido amplamente reconhecido. As primeiras descobertas, iniciadas em 1857 e nomeadas por Carl Benda em 1898, revelam que as mitocôndrias são organelos críticos para a regulação da homeostasia celular e a produção de ATP (Rossmann et al., 2021). Adicionalmente, a teoria endossimbiótica de Lynn Margulis, apresentada em 1967, mudou a maneira como entendemos a origem das mitocôndrias (San-Millán, 2023). Hoje sabe-se que as mitocôndrias são incrivelmente capazes de se adaptar a uma variedade de condições, uma das quais é o exercício físico (Zanini et al., 2021). Além disso, é conhecido que essas adaptações induzidas pelo exercício físico melhoram a eficiência metabólica e a qualidade mitocondrial, oferecendo benefícios preventivos e terapêuticos que não podem ser replicados por fármacos de uma forma tão pleiotrópica e não apresentam, de uma forma geral, efeitos secundários ou contraindicações (Oliveira et al., 2021). Efetivamente, a par de um inúmero conjunto de adaptações fisiológicas e bioquímicas, a melhoria da funcionalidade, eficiência e “qualidade” da rede mitocondrial induzida pelo exercício é essencial como estratégia não farmacológica para o tratamento e prevenção de diversas patologias (Oliveira et al., 2021).

Várias condições no contexto da investigação, nomeadamente no âmbito do exercício físico, ou da prática clínica, associada à disfunção mitocondrial induzida por diversas patologias, como doenças cardiovasculares, metabólicas e neurodegenerativas (Nolfi-Donagan et al., 2020) pode levar à necessidade de efetuar análises de função mitocondrial em momentos distintos e, porventura, incompatíveis com a viabilidade operacional. Nestas condições, deparamo-nos com a dificuldade de manter a funcionalidade dessas mitocôndrias durante o período de tempo necessário para poderem ser analisadas (Kuznetsov et al., 2003).

Por estas razões, o objetivo geral deste estudo é investigar soluções de preservação e condições de criopreservação que possam manter integra a funcionalidade mitocondrial em análises futuras.

Este trabalho está dividido em várias partes, entre as quais uma revisão da literatura sobre as mitocôndrias no contexto da biologia celular, as suas funções e mecanismos de adaptação no âmbito do exercício físico, o seu papel na patologia e a forma como o exercício se assume como factor de prevenção e terapia nessas patologias. Seguidamente, são discutidos os problemas metodológicos na avaliação mitocondrial e as soluções e condições de preservação e de criopreservação utilizadas. Cada capítulo foi incluído para fornecer uma compreensão completa e integrada do papel das mitocôndrias no contexto da saúde, do exercício físico e na doença, bem como para justificar a necessidade de novas metodologias para preservar e analisar a função mitocondrial ao longo do tempo.

2. Revisão da Literatura

2.1 As Mitocôndrias no contexto da biologia celular

A palavra mitocôndria tem a sua origem etimológica no grego “mítos”, que significa “linha” ou “fio”, e “khóndros” que significa “grânulo” ou “grão”. Contudo, foi só em 1898 que o microbiologista alemão Carl Benda a utilizou para caracterizar as pequenas estruturas encontradas no citoplasma das células eucarióticas e descritas em 1857 por Albert von Kölliker. À luz da microscopia ótica, estes organelos apresentavam formas muito variáveis, frequentemente aparecendo como fios ou com semelhanças com estruturas granulares (Rossmann et al., 2021).

Há cerca de 1,5 mil milhões de anos, as mitocôndrias originaram-se de uma linhagem procariótica ligada a arqueobactérias, cujo nome grego significa “bactérias antigas”. Em 1967, Lynn Margulis propôs uma teoria, a teoria endossimbiótica, segundo a qual organismos eucarióticos originaram-se a partir de microrganismos procarióticos aeróbicos que foram absorvidos por uma célula eucariótica, estabelecendo uma relação simbiótica benéfica para ambos (San-Millán, 2023).

As mitocôndrias são organelos celulares formados por membranas duplas (Faas & de Vos, 2020) que se encontram na grande maioria das células. Em

grande parte destas células, a densidade mitocondrial é especialmente elevada perinuclearmente (próximo ao núcleo) e próximo ao retículo endoplasmático (Casanova et al., 2023). No caso particular do músculo esquelético e cardíaco, as mitocôndrias apresentam uma distribuição habitualmente caracterizada como intermiofibrilar e subsarcolemal (Ferreira et al., 2010; Kavazis et al., 2017). Do ponto de vista metabólico, as mitocôndrias são responsáveis por inúmeros processos bioquímicos, incluindo os associados à fosforilação oxidativa (OXPHOS), nomeadamente o ciclo de Krebs, a beta-oxidação e a cadeia de transporte de eletrões (CTE), entre outros (Long et al., 2019). A partir destes processos, as mitocôndrias fornecem cerca de 90% da exigência celular de adenosina trifosfato (ATP) (Harris & Das, 1991). Para tal, estas oxidam substratos de carbono para gerar energia. Por seu lado, a hidrólise do ATP forma adenosina difosfato (ADP) e liberta energia para vários processos celulares, incluindo a manutenção de potenciais de membrana, a síntese de proteínas (Long et al., 2019), a regulação intracelular de cálcio (E. Murphy et al., 2016), a viabilização do mecanismo de apoptose, bem como um conjunto de respostas imunológicas que protegem o nosso organismo contra infeções e, por exemplo, patologias de origem oncológicas (Faas & de Vos, 2020). Da mesma forma, estes organelos regulam a homeostasia do ferro, a produção de hormonas e de diferentes neurotransmissores, como a melatonina (Casanova et al., 2023). Para além de contribuírem para a homeostasia celular através da produção de ATP, as mitocôndrias são organelos cruciais na regulação dos níveis de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) para a sinalização celular (Nolfi-Donagan et al., 2020). Adicionalmente, estudos relativamente recentes sugerem a implicação destes organelos na intercomunicação com outros organelos, nomeadamente em domínios estruturais conhecidos como membranas associadas às mitocôndrias (MAMs). O contacto físico com outros organelos, como o núcleo, lisossomas, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, permite regular a transferência de iões e metabolitos, e desempenhar um papel de sinalização e comunicação entre diferentes agentes celulares. Para além disso, vários estudos têm vindo a sugerir que as mitocôndrias estão envolvidas nos mecanismos de “*crosstalk*” com os “relógios circadianos”, a microbiota intestinal

e o sistema imunológico. De facto, estes organelos podem ser considerados como um centro fundamental de apoio e integração das atividades celulares em todos os domínios (Casanova et al., 2023).

Os processos de fosforilação são mecanismos ancestrais fundamentais para a síntese de ATP. Este processo envolve a conversão direta de ADP em ATP pela transferência direta de um grupo fosfato. Esse grupo fosfato é doado ou transferido de outra molécula fosforilada (Pinna et al., 2022). Nos seres vivos, as células são “verdadeiras máquinas” de gerar energia, ajustando constantemente o seu consumo à disponibilidade de nutrientes e à capacidade de produzir ATP. Neste sentido, o ATP funciona como a moeda energética da célula, gerado principalmente durante processos catabólicos, como a degradação de glicose, lípidos ou inclusivamente proteínas. As mitocôndrias apresentam uma relevância fundamental neste processo pois é no seu interior e através da OXPHOS que ocorre a maior parte da produção de ATP (Herzig & Shaw, 2018).

Como sugerido anteriormente, a CTE utiliza uma série de reações de transferência de eletrões, advindo em particular do ciclo de krebs e da beta-oxidação, motiva a formação de um gradiente eletroquímico que, em condições normais, permite gerar ATP através da fosforilação oxidativa (Ahmad et al., 2024). Efetivamente, o gradiente protónico desenvolvido pela CTE é utilizado para a produção de ATP ao nível da ATPase F1-FO e, em particular através da atividade da ATP sintase. Os complexos da CTE são estruturas multiproteicas, com diferentes níveis de complexidade, associadas à membrana interna da mitocôndria. Para que o transporte de eletrões seja feito de forma harmoniosa ao longo da CTE, a par dos 4 complexos, existem ainda transportadores móveis chamados coenzima Q (CoQ) e citocromo c (cit c) (Cogliati et al., 2021).

Durante este processo, em que as mitocôndrias utilizam o transporte de eletrões para gerar ATP, acabam por ser produzidas (ROS). Estas ROS, por um lado, especialmente em condições de stress, podem contribuir negativamente para a homeostasia celular induzindo oxidação de diferentes macromoléculas,

como os lípidos, as proteínas e o próprio ácido desoxirribonucleico (DNA) e, no limite, associar-se à ativação de vias de morte celular por apoptose, como por exemplo a via intrínseca mitocondrial. Por outro lado, quando a sua produção é adequadamente regulada, também funcionam como moléculas sinalizadoras, desempenhando papéis importantes na regulação celular (M. P. Murphy, 2009). De uma forma geral, em função dos níveis de stress a que as células são sujeitas e às exigências metabólicas das mesmas, a rede mitocondrial da maioria dos tecidos é regulada por sofisticados e complexos mecanismos de dinâmica mitocondrial, nomeadamente os associados à fusão e à fissão de componentes mitocondriais (Tilokani et al., 2018; Youle & van der Bliek, 2012). Estes mecanismos de fusão salvaguardam a capacidade da rede mitocondrial se tornar mais coesa e, por isso, mais eficiente do ponto de vista metabólico. Adicionalmente, existem ainda mecanismos de fissão, típicos de situações de stress e patológicas. Por outro lado, as mitocôndrias possuem, ainda, mecanismos de controlo de qualidade ou “mitofagia” para garantir o adequado funcionamento geral da rede. Estes mecanismos em associação com a referida dinâmica mitocondrial permitem regular a qualidade eliminando as mitocôndrias danificadas e mantendo as “saudáveis” (Song et al., 2015).

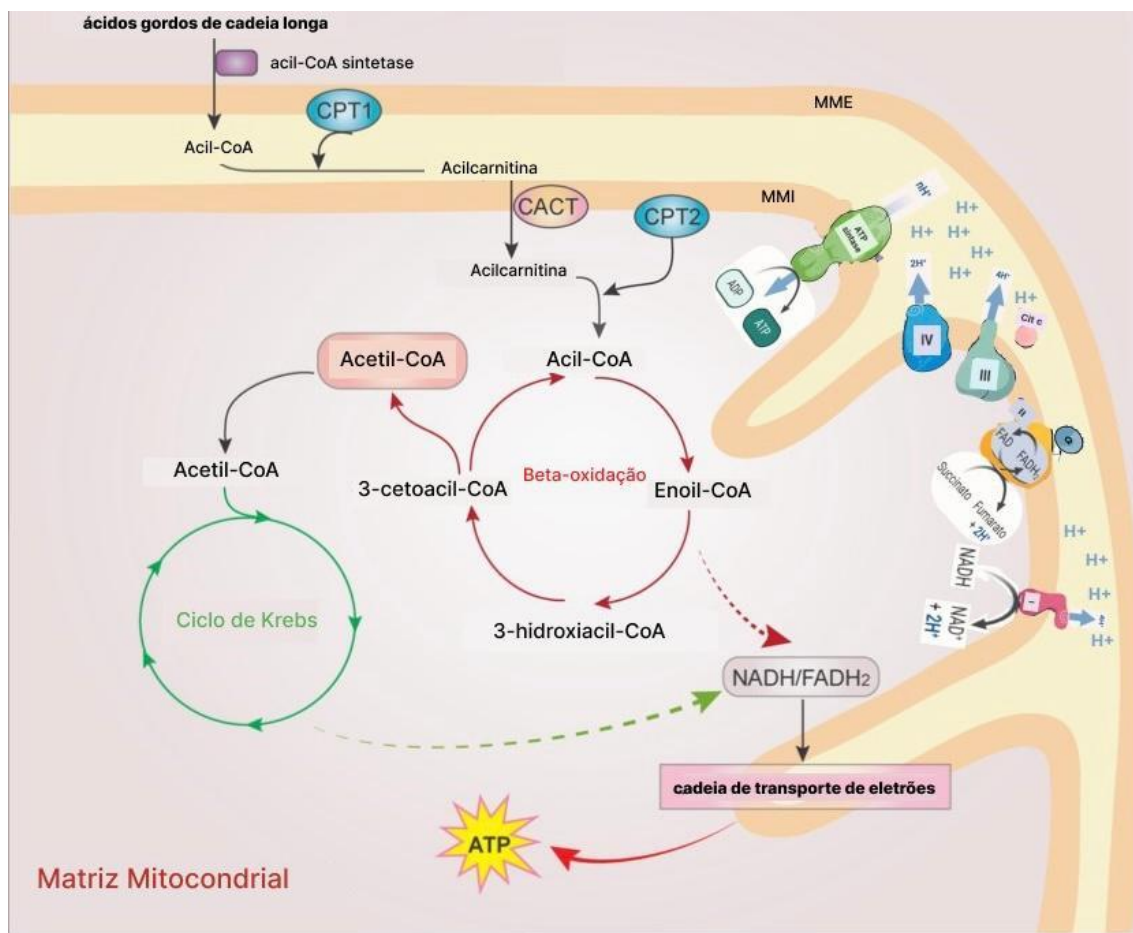


Figura 1 - Processos mitocondriais de produção de energia (adaptado de: Bian et al., (2020)).

2.2. As mitocôndrias no contexto do exercício físico (biogénese e dinâmica mitocondrial)

A eficiência e a qualidade da rede mitocondrial é essencial para a função celular em vários tecidos, contribuindo para a vitalidade de todas as funções fisiológicas do corpo humano, tanto em condições de saúde como em condições de doença. A extraordinária plasticidade das mitocôndrias permite que estas alterem o volume, a estrutura e a capacidade de resposta consoante diversas condições, nomeadamente o exercício físico (Memme et al., 2021).

A complexa interação entre o exercício e a rede mitocondrial tem demonstrado ter um impacto biunívoco positivo na capacidade de adaptação orgânica e na eficiência da resposta do organismo a diferentes estímulos. De facto, é verdade que a realização de exercício físico, particularmente de forma

crônica, parece estimular a eficiência da rede mitocondrial e a sua capacidade para mitigar o impacto nefasto de diversas condições de stress orgânico, como sejam as associadas a diferentes condições patológicas. Por outro lado, esta mesma eficiência aumentada da rede propicia um incremento da predisposição para o desempenho desportivo otimizado a diferentes níveis e consequentemente, uma ainda maior estimulação e aptidão da rede. Certamente por estas razões, está suficientemente documentado na literatura científica que a prática de exercício físico é um potente estimulador da rede mitocondrial, essencialmente à custa da estimulação da biogénese, dinâmica mitocondrial e controlo de qualidade (como acima referido) com reflexos evidentes na melhoria da performance e que, por outro lado, a melhoria da qualidade da rede mitocondrial induzida pelo exercício físico é, hoje em dia, uma potente estratégia não farmacológica a utilizar na prevenção e terapêutica de um vasto conjunto de condições patológicas (Hood et al., 2011; Mesquita et al., 2021; Reisman et al., 2024). De entre um conjunto vasto de adaptações, o exercício físico promove adaptações na biogénese das mitocôndrias, estimulando a sua remodelação através da ativação do seu regulador-chave, o coativador 1-alfa do recetor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α) (Zanini et al., 2021). Este fator de transcrição desempenha um papel-chave na regulação da biogénese mitocondrial a nível nuclear e é regulado por diversas vias de sinalização, nomeadamente a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteína quinase B (AKT), sirtuína 1 (SIRT1), proteína quinase ativada por mitógenos p38 (p38 MAPK), e a via de sinalização do cálcio que envolve o fator potenciador específico de miócitos 2C (MEF2C) e D (MEF2D), a proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB), e a proteína quinase dependente de cálcio (CAMK) (Roberts & Markby, 2021). Após desacetilação e fosforilação, o PGC-1 α atua como um coativador transcricional, interagindo com vários fatores de transcrição, como o fator respiratório nuclear 1 (NRF1), fator nuclear eritroide 2 relacionado (NRF2) e o recetor relacionado ao estrogénio alfa (ERR α). Em conjunto aumentam a expressão de diversos genes envolvidos na replicação do DNA mitocondrial, em particular genes relacionados com a atividade da cadeia respiratória e do metabolismo oxidativo, bem como do o fator

de transcrição mitocondrial A (TFAM) com implicações diretas no aumento da expressão de genes mitocondriais e, concomitantemente, com a expressão de proteínas codificadas a nível mitocondrial (Austin & St-Pierre, 2012).

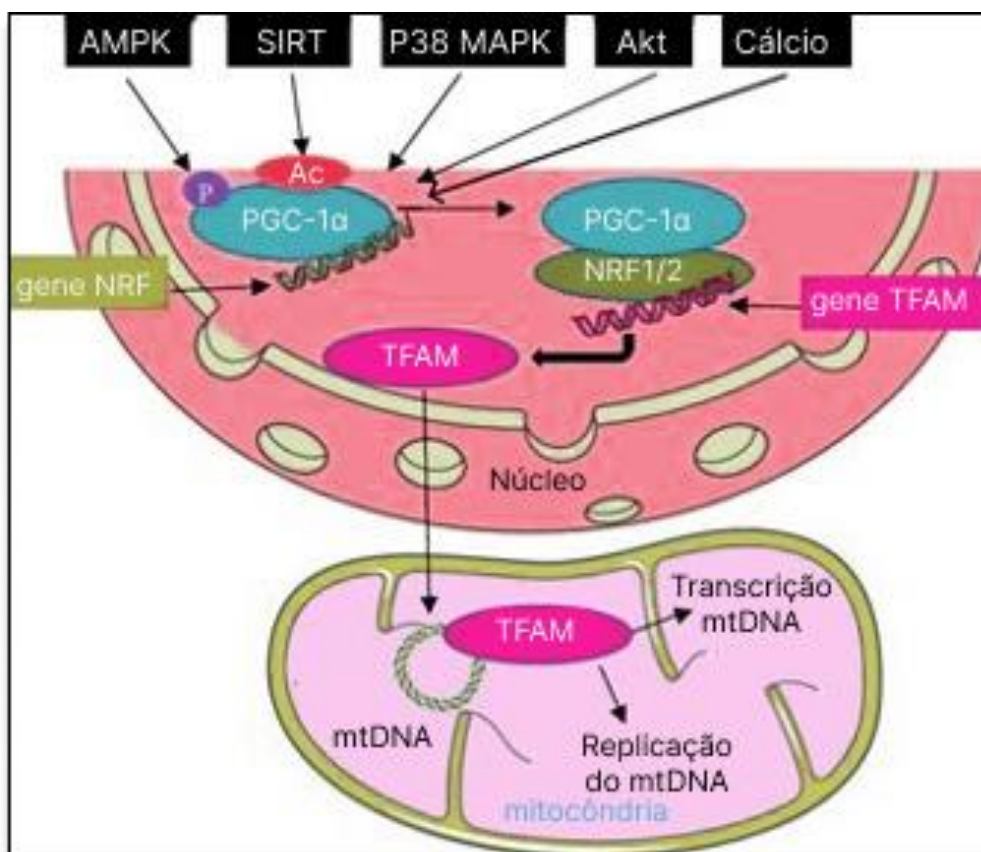


Figura 2 - Regulação da biogênese mitocondrial (adaptado de Quan et al., (2020)).

Abreviaturas: PGC-1 α , Coativador 1-alfa do Receptor Gama Ativado por Proliferadores de Peroxissoma; AMPK, Proteína Quinase Ativada por AMP; SIRT, Sirtuínas; p38 MAPK, Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38; AKT, Proteína Quinase B; NRF1/2, Fator Nuclear Eritroide 1 e 2 Relacionado; TFAM, Fator de Transcrição Mitocondrial A; mtDNA, ADN Mitocondrial; CTE, Cadeia de Transporte de Elétrões.

Além disso, o PGC-1 α tem impacto nos mecanismos de dinâmica mitocondrial, anteriormente referidos, incluindo os processos de fusão e fissão. A fusão mitocondrial, mediada por proteínas como a mitofusina-1 (MFN1), a mitofusina-2 (MFN2) e a proteína associada à opacidade (OPA), é essencial para a manutenção da integridade mitocondrial e para a resposta adaptativa à demanda de energia aumentada durante o exercício. Por outro lado, a fissão,

controlada por proteínas como a proteína relacionada com a dinamina 1 (DRP1) e Proteína de Fissão 1 (FIS1), associa-se à desagregação da rede e permite a ativação da mitofagia e remoção de mitocôndrias danificadas (Gu et al., 2021).

Em suma, o PGC-1 α é um regulador mestre da biogênese mitocondrial, coordenando a expressão de uma ampla gama de genes envolvidos na produção de novas mitocôndrias e na melhoria da função mitocondrial. A sua ativação pelo exercício físico é fundamental para as adaptações metabólicas que melhoram a capacidade de resistência e a saúde muscular (Austin & St-Pierre, 2012).

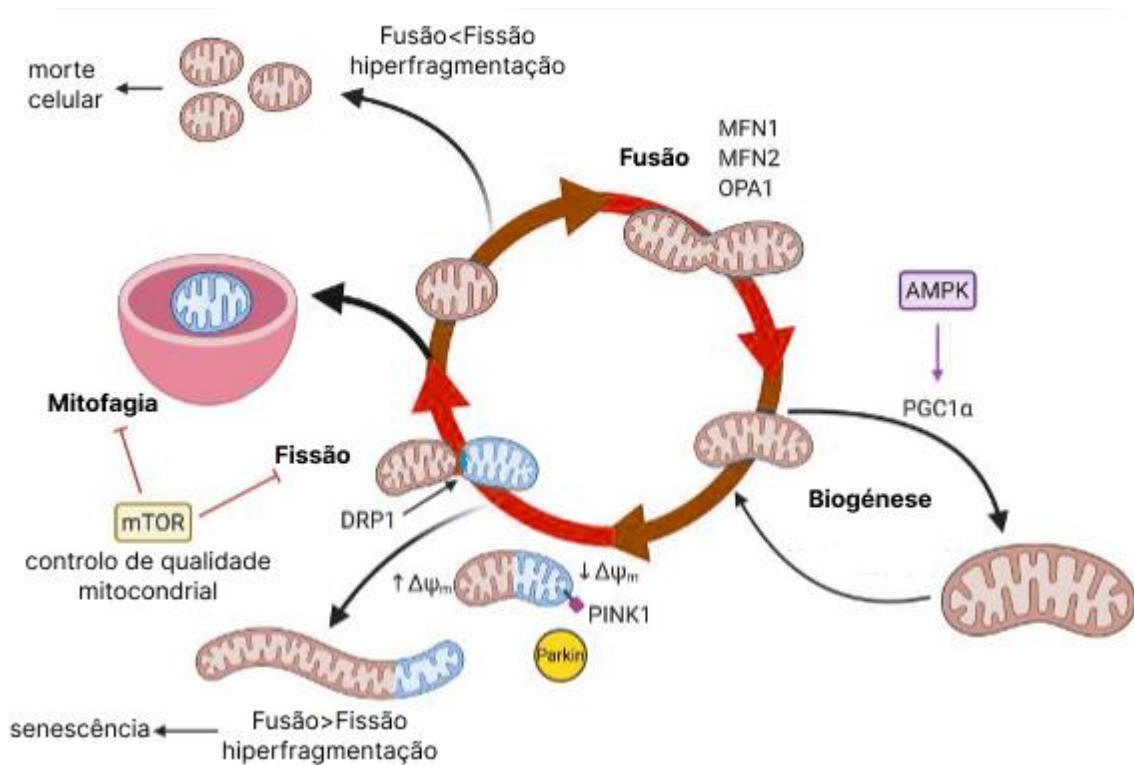


Figura 3 - Mecanismos de dinâmica e controle de qualidade mitocondrial (adaptado de: Garbern & Lee, (2021)).

Abreviaturas: DRP1, Proteína Relacionada à Dinamina 1; FIS1, Proteína de Fissão 1; MFN1, Mitofusina 1; MFN2, Mitofusina 2; OPA1, Proteína Óptica Atrofia 1; PINK1, PTEN-Induced Kinase 1.

2.3. As mitocôndrias no contexto da patologia

Peter Siekevitz classificou, em 1957, as mitocôndrias como a “central de força” da célula. Menos de dez anos depois, foram divulgados os primeiros trabalhos sugerindo que este organelo produzia ROS como subproduto da respiração celular. Na atualidade, sabemos que as mitocôndrias são organelos extremamente dinâmicos e indispensáveis à homeostasia celular, produzindo níveis elevados de ATP e baixos níveis de ROS determinantes para a ativação de inúmeras de sinalização celular. Este pressuposto é tão relevante que a disfunção em qualquer um desses processos tendo vindo a ser associada a muitas condições patológicas (Nolfi-Donagan et al., 2020). A este propósito, (Brookes et al., 2004) sugeriram a existência de uma relação de “amor e ódio” entre o cálcio, ATP e ROS para o funcionamento e homeostasia mitocondrial com impacto obvio na saúde e na patologia. Neste *“mitochondrial love-hate triangle”*, os autores exploram a interação entre esses três elementos e a sua interdependência. O equilíbrio correto entre os níveis mitocondriais de cálcio, ATP e ROS parecem ser vitais para a viabilidade celular, mas um desequilíbrio pode levar a condições patológicas severas, como doenças neurodegenerativas e isquemia/reperfusão. De facto, em condições de stress e patológicas o excesso de cálcio pode levar à sobrecarga mitocondrial, resultando em disfunção e morte celular, a produção de ATP depende de um delicado equilíbrio entre os níveis de cálcio e a atividade das mitocôndrias e, se em concentrações adequadas, as ROS funcionam como moléculas de sinalização, regulando processos celulares, níveis elevados de ROS causam danos oxidativos às proteínas, lipídios e DNA mitocondriais, contribuindo para a sua disfunção. Note-se, no entanto, que a importância de cada uma dessas funções depende do tipo de célula. Por exemplo, os cardiomiócitos dependem das mitocôndrias para fornecer mais de 95% da energia necessária para a sua função. Por outro lado, as células endoteliais dependem mais da glicólise do que das mitocôndrias para produzir ATP. No entanto, a produção de ROS mitocondriais também é fundamental para a sinalização homeostática endotelial.(Nolfi-Donagan et al., 2020).

Por estas razões, a avaliação da fosforilação oxidativa mitocondrial é crucial para o diagnóstico de várias doenças e investigação no âmbito da fisiologia mitocondrial. Estes trabalhos podem ser realizados em amostras de biópsia congeladas, utilizando métodos histoquímicos, enzimáticos ou histológicos, no entanto, a análise direta da função mitocondrial, através da avaliação da respiração acoplada e a síntese de ATP é particularmente importante (Kuznetsov et al., 2003).

Muitas doenças, como a diabetes tipo 2 (DT2), algumas doenças cardiovasculares (DCV), a síndrome metabólica, o cancro, patologias hepáticas não alcoólicas, a doença de Alzheimer (DA), entre outras estão associadas à desregulação da função mitocondrial e da bioenergética celular. Embora a disfunção mitocondrial esteja presente em várias doenças não transmissíveis (DNT), a etiologia e a patogénese da disfunção mitocondrial ainda não foram totalmente esclarecidas e são objeto de importantes pesquisas biomédicas na atualidade. Por exemplo, a associação entre a disfunção mitocondrial e a probabilidade de ocorrência de enfarte do miocárdio e cardiomiopatia em diversos pacientes está a tornar-se cada vez mais evidente (E. Murphy et al., 2016). Da mesma forma, vários fenótipos clínicos comuns, como miopatias, neuropatias, nefropatias, distúrbios endócrinos e doenças metabólicas têm vindo a ser associados a condições de disfunção mitocondrial. Por estas razões, a investigação sobre a complexa interação entre a função mitocondrial, o metabolismo e a morte celular pode fornecer novos e importantes “insights” e alvos para tratamentos (E. Murphy et al., 2016). Na verdade, a disfunção mitocondrial continua a ser uma das condições metabólicas mais desafiantes no contexto clínico (San-Millán, 2023). Adicionalmente, em cerca de 1 em cada 5.000 nascimentos o recém-nascido sofre de disfunção mitocondrial, uma doença degenerativa que afeta vários sistemas do corpo. Entre outros, o comprometimento da funcionalidade do complexo I (CI) da cadeia respiratória, também conhecido como nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto (NADH): ubiquinona oxidoreductase, é uma das formas mais comuns de disfunção mitocondrial (Grad et al., 2005).

2.4. As mitocôndrias no contexto do exercício clínico: A sua utilização como estratégia não farmacológica preventiva e terapêutica

No contexto do exercício clínico, as mitocôndrias ganham destaque como um alvo terapêutico e preventivo. De facto, a realização de exercício físico pressupõe um incremento drástico das exigências energéticas celulares e, com isso, a necessidade das mitocôndrias aumentarem a sua atividade metabólica, resultando na produção de mais ATP. A realização sistemática de exercício estimula mecanismos de adaptação crónica do metabolismo oxidativo mitocondrial, como sejam a biogênese mitocondrial, aumentando tanto o número quanto a eficiência das mitocôndrias nas diferentes células do nosso organismo com benefícios evidentes para a homeostasia celular (Irrcher et al., 2003; Lim et al., 2022; Seo et al., 2019).

O envelhecimento e diversas condições patológicas apresentam fenótipos mitocondriais que contribuem para a inflexibilidade metabólica e o estado pró-oxidante. Por outro lado, como referido anteriormente, o exercício físico melhora a eficiência metabólica alterando diretamente o conteúdo e a qualidade das mitocôndrias através de várias vias de sinalização atrás referidas. Isso oferece um potencial preventivo e terapêutico e torna o exercício numa estratégia que provavelmente não pode ser replicada farmacologicamente (Oliveira et al., 2021).

Por outro lado, indiretamente, o PGC-1 α regula a expressão de várias miocinas nos músculos esqueléticos, incluindo a irisina, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a miostatina que desempenham um impacto metabólico sistémico em diversos tecidos do nosso organismo (Cheng et al., 2018). Estas vias de sinalização de “tipo endócrino” podem afetar a expressão de genes e proteínas que controlam, “à distância” a biogênese mitocondrial e a dinâmica mitocondrial em diversos tecidos. As miocinas controlam a comunicação entre o músculo e vários outros órgãos, como o cérebro, o tecido adiposo, os ossos, o fígado, o intestino, o pâncreas, o leito vascular e a pele, além das condições dentro do próprio músculo (Lim et al., 2022) (Severinsen & Pedersen, 2020).

A par de uma série intrincada de efeitos fisiológicos e bioquímicos, estes sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos participam, também, na rede de comunicação celular que regula a complexa biogénese mitocondrial. Estes sinais são essenciais para que o corpo mantenha a homeostasia e funcione corretamente (Liu et al., 2023). A descoberta de miocinas induzidas pelo exercício sugere que os músculos esqueléticos desempenham um papel importante na manutenção sistémica da homeostasia metabólica. Embora os mecanismos precisos não estejam claros, a contração do músculo esquelético e a preservação da massa muscular parecem estar envolvidos na manutenção de condições fisiológicas adequadas, entre as quais a melhoria da função mitocondrial, e na prevenção do desenvolvimento de vários tipos de doenças (Kwon et al., 2020).

Como exemplo do papel relevante de diferentes miocinas, através da sua capacidade de estimular a sinalização da AMPK, aumentar a captação de glicose e melhorar a lipólise, as miocinas são agora consideradas potenciais candidatas ao tratamento de alguns distúrbios metabólicos, como a DT2 e a obesidade (So et al., 2014). Além disso, algumas miocinas ainda afetam positivamente a cognição, o perfil metabólico do tecido adiposo, a formação óssea, a função das células endoteliais, a hipertrofia muscular, a estrutura da pele e o crescimento tumoral (Severinsen & Pedersen, 2020).

Mais recentemente, o termo 'exercinas', a par da expressão "miocinas", sugere a expressão de um conjunto de substâncias que, em resposta ao exercício, podem ter um impacto em todo o corpo, induzindo a comunicação inter-órgãos (cross-talk) e o respetivo metabolismo (Posadzki et al., 2020). Estas "exercinas" têm demonstrado ter um grande impacto na saúde (Posadzki et al., 2020), tal como na eficácia em intervenções ao melhorar prognósticos de doenças como depressão, ansiedade e outras doenças mentais (Singh et al., 2023), na saúde cardiovascular (Pinckard et al., 2019) e na eficiência do sistema imunológico (Chastin et al., 2021). Além disso, tem vindo a ser sugerido que o exercício regular desempenha um papel importante no tratamento não só de patologias neurodegenerativas, pois diminui o risco de seu surgimento e impede que eles avancem, mas também em inúmeras doenças crónicas e/ou

relacionadas com o envelhecimento, como distúrbios musculoesqueléticos e metabólicos (Bonanni et al., 2022).

2.5. Problemas metodológicos associados à realização de protocolos de avaliação mitocondrial

No contexto da investigação de âmbito metabólico e, especificamente, da fisiologia mitocondrial, a preservação da “qualidade” e viabilidade das mitocôndrias para análises funcionais é um desafio metodológico que pode comprometer a validade e interpretação dos resultados obtidos e, ainda hoje, não foi completamente resolvido (Kuznetsov et al., 2003). De facto, por esta razão, a avaliação da funcionalidade mitocondrial, através de técnicas de respirometria, pressupõe a realização dos ensaios durante um período muito curto face ao momento em que as amostras biológicas foram obtidas. De uma forma geral, tem sido considerado que existe uma “janela de oportunidade” temporal de cerca de 2 a 4 horas durante a qual as mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos, as fibras permeabilizadas ou extratos de tecidos podem ser utilizados, sem comprometer a “viabilidade” destas amostras. Em muitas circunstâncias as amostras de tecido biológico, nomeadamente obtidas a partir de biópsias humanas, são congeladas para tratamento futuro por técnicas que já não pressupõem a manutenção de toda a integridade e viabilidade celular, como por exemplo técnicas no âmbito da proteómica, genómica, lipidómica, etc. No entanto, as membranas mitocondriais são afetadas por esta técnica, o que torna, até ao momento, inviável futuras análises da função respiratória em amostras previamente congeladas (Zuccolotto-Dos-Reis et al., 2021). Dados recentes sugerem, no entanto, que variações na composição celular e no conteúdo lipídico podem afetar a eficiência da criopreservação e a viabilidade das mitocôndrias após o descongelamento (Ebanks et al., 2023). Porém, é importante que a sensibilidade dos instrumentos de avaliação da funcionalidade da nova geração, como o Oroboros O₂k, seja suficiente para identificar alterações subtis na função mitocondrial, principalmente em amostras que foram previamente congeladas (Doerrier et al., 2018). Tendo em conta a complexidade metodológica da maioria dos protocolos experimentais, sejam estes realizados

com amostras biológicas humanas ou animais, a inviabilidade da criopreservação para futura avaliação da funcionalidade mitocondrial tem sido um obstáculo metodológico muitas vezes difícil de operacionalizar em tempo útil.

Adicionalmente, o garante da sofisticação dos instrumentos e da qualidade dos resultados obtidos com instrumentos de respirometria com alta resolução “esbarra” no elevado custo destes o que dificulta a existência de um número elevado de aparelhos por laboratório e a realização em simultâneo de muitos ensaios. Por esta razão, soluções metodológicas viáveis no âmbito da criopreservação mitocondrial podem ser uma solução útil para este problema, pois permitem a preservação e avaliação de amostras *à posteriori* sem perda de funcionalidade. Esta abordagem é vital, por exemplo, para a investigação básica e tecnologias de reprodução assistida, onde a funcionalidade mitocondrial é fundamental para o sucesso do desenvolvimento embrionário (Gualtieri et al., 2021). Tendo em consideração o atrás referido, o presente estudo colocou como hipótese que soluções de preservação hipotérmicas de transplante podem ser um instrumento útil para preservar a função mitocondrial durante um curto período de tempo e possibilitar a sua avaliação num contexto de alta resolução.

Recorrendo à utilização de uma câmara fechada, a respirometria mitocondrial é determinada pela taxa de concentração de oxigénio, que diminui à medida que a amostra biológica consome oxigénio. O uso de eléctrodos de oxigénio, como o eléctrodo de Clark, para medir a concentração de oxigénio, contribuiu para uma compreensão mais profunda do papel da respiração mitocondrial. O eléctrodo de oxigénio ainda é um método barato e útil para avaliar a respiração mitocondrial. No entanto, os seus problemas incluem sinais instáveis e ruído de fundo instrumental relativamente alto. Os sistemas de respirometria Oroboros O₂k usam polímeros de vidro, câmaras de reação fechadas e herméticas e baixa permeabilidade ao oxigénio (O₂). Isso minimiza a retrodifusão de O₂ e superestimções de respiração, e os sensores podem detetar mudanças no O₂ com pouco ruído. Com eléctrodos altamente sensíveis e vazamento mínimo de O₂, o Oroboros O₂k-oxygraph maximiza a sensibilidade e precisão respirométricas. Em comparação com outros sistemas que exigem avaliações

visuais da cinética de estado estacionário, os avanços do software Datlab nas derivações de fluxo de mudanças no O_2 da câmara permitem relatórios de cinética respiratória em tempo real, o que melhora a análise de dados. Além disso, as possíveis fontes de erro sistemático incluem o consumo inevitável de O_2 de fundo pelo próprio eletrodo, juntamente com os diferentes graus de retrodifusão de O_2 na câmara oxigráfica. Para obter determinações precisas do consumo absoluto de O_2 , o consumo instrumental global de O_2 , que aumenta positivamente em função da pressão de O_2 (PO_2) deve ser ajustado em sistemas de alta resolução (Long et al., 2019).

Por todas estas razões, o objetivo principal do presente trabalho é avaliar a função respiratória mitocondrial de amostras de tecido de músculo cardíaco, conservadas em diferentes tipos de soluções de preservação e criopreservação, e analisar a forma como esta varia ao longo do tempo.

2.6. Soluções e método de criopreservação

Considerando o contexto discutido anteriormente, é amplamente reconhecido que a preservação das mitocôndrias musculares para análises funcionais a longo prazo representa um desafio significativo, ainda não completamente resolvido na pesquisa clínica de doenças metabólicas e na investigação da fisiologia mitocondrial. O tempo limitado para avaliar essas amostras antes que ocorra perda funcional constitui uma limitação importante (Kuznetsov et al., 2003).

Nesse cenário, a criopreservação desses tecidos mitocondriais surge como uma abordagem viável, pois pode prolongar a viabilidade das mitocôndrias, permitindo avaliações mais detalhadas em momentos posteriores, em vez de imediatamente após a colheita. No entanto, é importante salientar que, dada a ausência de métodos estabelecidos na literatura científica, é necessário tomar decisões com certo grau de incerteza. Assim, optamos por utilizar duas soluções de preservação: o Custodiol (CO) (também conhecido como solução de histidina-triptofano-cetoglutarato, ou HTK) e o Hypothermosol (HT). Ambas as soluções foram selecionadas com base nas suas propriedades conhecidas de proteção celular durante o armazenamento a baixas temperaturas.

O CO, amplamente utilizado em transplantes de órgãos sólidos, contém histidina, triptofano e cetoglutarato, que ajudam a proteger as células contra a isquemia e o stress oxidativo. A sua aplicação específica para amostras mitocondriais ainda começou recentemente a ser explorada, mas a sua eficácia geral está bem documentada (Dulguerov et al., 2024; Edelman et al., 2013).

Por sua vez, o HT é uma outra solução de preservação que visa manter a viabilidade celular durante o armazenamento. Esta solução contém eletrólitos, nutrientes essenciais e antioxidantes, proporcionando um ambiente favorável para o funcionamento celular. Além disso, o Hypothermosol é sugerido para minimizar os níveis de stress oxidativo e manter a integridade mitocondrial (Freitas-Ribeiro et al., 2022; Petrenko et al., 2019).

Para otimizar ainda mais a qualidade e eficácia funcional da criopreservação, adicionamos, ainda, alguns agentes crio-protetores como a solução de perfusão cardioplégica (BIOPS) e o dimetilsulfóxido (DMSO). O BIOPS fornece nutrientes essenciais e mantém a homeostase celular durante o processo, enquanto o DMSO atua como crioprotetor, reduzindo o dano causado pelo congelamento e descongelamento (Whaley et al., 2021).

Adicionalmente, foi utilizado um método de congelamento sequencial, aplicando temperaturas cada vez mais baixas para manter a funcionalidade biológica. Antes da criopreservação, o DMSO foi adicionado imediatamente a cada tubo de congelamento. Após permanecerem 6 minutos no gelo a cerca de 2-4 °C, as amostras foram transferidas para um tubo de gargalo de um tanque de nitrogênio líquido de 20 L (série MVE 2001 – Doble 20), posicionado a aproximadamente 10-15 cm do topo. A tampa foi fechada por 10 minutos, sem o tampão inserido. As amostras foram então expostas a vapores de nitrogênio a -110 °C. Por fim, as amostras foram totalmente submersas em nitrogênio líquido a cerca de -196 °C durante, pelo menos, 10 minutos dentro do recipiente interno do tanque (García-Roche et al., 2018).

Em resumo, a escolha criteriosa destas soluções visou preservar a função mitocondrial e possibilitar análises mais aprofundadas no contexto da investigação básica.

3. Considerações, objetivos e hipóteses do presente trabalho

Considerando que:

- 1) Muitas patologias, como sejam as neurodegenerativas, cardiovasculares e metabólicas, estão relacionadas com a disfunção mitocondrial;
- 2) A prática de exercício físico aumenta a eficiência e a qualidade da rede mitocondrial e oferece vantagens preventivas e terapêuticas em diferentes contextos no âmbito da saúde;
- 3) Um grande desafio na investigação em fisiologia mitocondrial é a capacidade de preservar a qualidade e a viabilidade das mitocôndrias para análises por meio de técnicas de respirometria;
- 4) E que o problema de preservar a funcionalidade mitocondrial para análises a longo prazo ainda não foi resolvido,

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) Avaliar a capacidade de soluções de preservação e diferentes condições de criopreservação, em manter a funcionalidade mitocondrial após armazenamento a curto e longo prazo;
- 2) Investigar de que forma as metodologias de preservação e criopreservação afetam a integridade funcional e estrutural das mitocôndrias;
- 3) Identificar as principais deficiências e problemas metodológicos na preservação e criopreservação mitocondrial e sugerir melhorias com base nos resultados.

Com base nos referidos objetivos, estipulamos as seguintes hipóteses:

- 1) A utilização de soluções utilizadas na preservação de órgãos para transplantes, como o Custodiol, ajudam a preservar a funcionalidade mitocondrial.
- 2) A utilização de soluções de preservação e condições de criopreservação adequadas garante a integridade estrutural e funcional das mitocôndrias, o que permite análises reprodutíveis e precisas em momentos posteriores à sua colheita.
- 3) A eficiência das soluções de preservação e condições de criopreservação depende da manipulação de várias condições experimentais, e a adaptação de protocolos para cada situação específica pode melhorar a eficiência mitocondrial.

Esperamos que este estudo ajude a desenvolver métodos mais eficazes para preservar a funcionalidade mitocondrial, após longos períodos de armazenamento. Isso aumentará a validade e a interpretação dos resultados de estudos de fisiologia mitocondrial e possibilitará a melhoria do conhecimento da função mitocondrial em diversos contextos, nomeadamente no âmbito do exercício físico e da saúde.

4. Material e métodos

4.1. Caracterização e modelo do animal

No contexto do presente trabalho, utilizou-se frações de músculo cardíaco de ratos Sprague Dawley mantidos em condições *ad libitum* de comida e água, seguindo a dieta standard (dieta purina #5008, Research Diet inc.) e acondicionados aos pares em gaiolas ventiladas no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, num ambiente controlado de humidade, água e temperatura (22 °C) e com um ciclo de luz de 12h.

Os animais foram eutanasiados entre as 21 e as 23 semanas, sob anestesia volátil com sevoflurano a 8% por excisão do coração. Todos os procedimentos foram revistos e aprovados pelo comitê de ética local da instituição (8161/23-S), seguindo a regulamentação sobre Bem-Estar Animal (DL 129/92, DL 197/96; P1131/97), a Diretiva da UE 2010/63/UE para experimentação com animais e o Guia para o Cuidado e Uso de Laboratórios Animais publicados pelo Instituto Nacional de Saúde (Publicação dos Institutos Nacionais de Saúde nº 85–23, revisto em 2011).

4.2. Preparação do tecido

Após o sacrifício dos animais e a colheita das amostras, foi retirado o excesso de sangue com compressas e separou-se o ventrículo esquerdo (VE) do ventrículo direito (VD). O VE foi dividido em 3 porções e colocadas, respetivamente, em tubos com BIOPS (10 mM Ca-EGTA buffer, 0.1 μ M free calcium, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM K-MES, 0.5 mM DTT, 6.56 mM $MgCl_2$, 5.77 mM ATP, 1.5 mM phosphocreatine, pH 7.1), Custodiol (CO) e Hypothermosol (HT).

As amostras de VD foram divididas em duas porções, sendo uma colocada em BIOPS e outra numa solução de corte para futura preparação das Fatias de Miocárdio Vivas (ou *Living Myocardial Slices* (LMS)) e uso no sistema MyoDish a 37 °C e outra em BIOPS. Para o efeito, o tecido cardíaco foi colocado numa placa de petri com gelo e as “fatias” de fibras foram preparadas.

As amostras de VD e VE colocadas em tubos com BIOPS no gelo foram analisadas a fresco, ou seja, imediatamente após a colheita.

Para as amostras destinadas à preservação a curto prazo, adotamos duas abordagens distintas: armazenamento em tecido e armazenamento em forma de fibras isoladas. Relativamente ao armazenamento em tecido, secções do ventrículo esquerdo foram mantidas nos respetivos meios de preservação, sem qualquer manipulação, na sua forma original e apenas manipulado para feixes de fibras no dia da experiência. Quanto ao armazenamento em fibras, no dia da colheita uma secção do ventrículo foi usada para obter feixes de fibras cardíacas

recorrendo ao uso de pinças para as separar, mantendo-as, no entanto, conectadas à rede de tecido, num processo conhecido por “*teasing*”.

Por outro lado, para a criopreservação a longo prazo, as amostras foram armazenadas, unicamente, na forma de fibras.

4.3. Soluções de preservação a curto prazo

4.3.1. Amostras mantidas no sistema MyoDish (*Living Myocardial Slices* – LMS)

A preparação das fatias foi baseada segundo o protocolo descrito anteriormente por (Watson et al., 2017). Resumidamente, as amostras foram cortadas com 300 µm de espessura a 0.03 mm/s num vibratômio (7000 smz-2, Campden Instruments, Reino Unido) em solução de corte modificada contendo 30 mM BDM, 1 mM Glucose, 10 mM HEPES, 12 mM KCl, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂. As avaliações funcionais foram efetuadas num sistema de cultura de tecidos MyoDish (InVitroSys, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, em meio M199 sem glucose. O meio foi suplementado com ITS Supplement, 10% de soro bovino fetal (FBS), 5 ng/ml VEGF, 10 ng/ml FGF-basic, e 2x Antibiotic-Antimycotic para melhorar a viabilidade celular. Para cada fatia, foi adicionada glucose e beta-hidroxibutirato (BHB) ao meio de cultura para corresponder aos níveis sanguíneos do animal no momento do sacrifício, definidos como condições de base. As fatias foram mantidas sob uma estimulação de campo de 1 Hz, 50 mA, 3 ms, utilizando uma pré-carga inicial definida para 1 mN, durante 2 e 4 dias. O comprimento ótimo foi definido como a pré-carga em que a força de contração era máxima.

Ao fim dos 2 e 4 dias, as fatias retidas no sistema foram colocadas em Biops, em gelo, e seguiu-se o processamento da amostra em fibras como descrito na secção anterior.

4.3.2. Amostras preservadas com Custodiol e Hypothermosol

As amostras do VE foram colocadas em tubos com os respectivos meios de preservação. Utilizaram-se dois tubos de Custodiol (CO), sendo um armazenado a uma temperatura de 4 °C e outro a temperatura ambiente (este processo foi repetido 2 vezes uma delas para fibras outra para tecido). Armazenamos fibras e tecido e avaliámos a sua função mitocondrial a fresco, um, três e sete dias após a colheita. Da mesma forma, outras amostras foram colocadas em tubos com meio de preservação Hypothermosol (HT) à temperatura de 4 °C, tendo-se realizada o mesmo procedimento metodológico de avaliação referido anteriormente.

4.4. Criopreservação mitocondrial a longo prazo

Relativamente à criopreservação a longo prazo, as amostras foram colocadas em cinco condições diferentes, armazenadas a -80 °C e avaliadas um e dois meses após a colheita. As condições foram as seguintes:

1. BIOPS com 10 mg/ml albumina de soro bovino (BSA) e 30% DMSO com “congelação instantânea”, introduzindo a amostra imediatamente em azoto (N₂) líquido;
2. BIOPS com 10 mg/ml BSA e 30% DMSO com congelação sequencial (8 min a 4 °C, 10 min em N₂ gasoso e pelo menos 10 min em N₂ líquido);
3. CO com 1mg/ml BSA e 10% DMSO com congelação sequencial;
4. HT com 1mg/ml BSA e 10% DMSO com congelação sequencial;
5. BIOPS 10 mg/ml BSA e 10% DMSO com congelação sequencial.

Por conseguinte, preparámos cada solução de criopreservação com BSA livre de ácidos gordo e adicionámos o DMSO imediatamente antes da criopreservação. Especificamente, para a condição 1 e 2 foi colocado BSA (10 mg/ml) com 700 µL BIOPS + 300 µL DMSO, para a condição 3 foi colocado BSA (1 mg/ml) com 800 µL CO + 100 µL DMSO, para a condição 4 foi colocado 1mg BSA (1 mg/ml), com 900 µL HT + 100 µL DMSO e para a condição 5 foi colocado BSA (10 mg/ml) com 900 µL BIOPS + 100 µL DMSO. De seguida, os feixes de

fibras foram colocados nos respectivos tubos e guardados a -80 °C até serem avaliadas.

4.5. Metodologia de permeabilização das fibras

Para permeabilizar as fibras musculares cardíacas, começámos com amostras que foram preservadas em tecido e outras que já haviam sido preservadas como fibras. Apesar dos diferentes métodos de preservação (tecido *versus* fibras), todas as amostras foram tratadas de igual forma durante a permeabilização, sendo que, como vai ser explicado mais à frente, as amostras preservadas primeiramente na forma de tecido, são transformadas em fibras durante a primeira etapa da permeabilização. Inicialmente, colocámos um pequeno segmento de biópsia do miocárdio em solução de preservação - BIOPS (tampão Ca-EGTA 10 mM, cálcio livre 0.1 µM, imidazol 20 mM, taurina 20 mM, K-MES 50 mM, DTT 0.5 mM, 6.56 mM MgCl₂, ATP 5.77 mM, fosfocreatina 15 mM, pH 7.1). Posteriormente, tal como já referido, coloca-se o tecido numa pequena placa de Petri gelada onde é separado mecanicamente em feixes de fibras usando dois pares de pinças afiadas, sendo que as amostras que já haviam sido preservadas em forma de fibras foram apenas colocadas em BIOPS sem a necessidade de alguma manipulação adicional. Os feixes de fibras resultantes foram introduzidos de seguida numa solução de saponina (20 µL) preparada a fresco + BIOPS (2 mL de BIOPS) durante 30 min com agitação suave e depois colocados num outro poço com 2 mL de meio de respiração mitocondrial MiR06 [composto por MiR05 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria: EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, ácido lactobiônico 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-sacarose 110 mM e 1 g/L BSA essencialmente livre de ácidos gordos, pH 7.1) suplementada com 280 U/mL de catalase], por 15 min em gelo, sob agitação suave.

4.6. Protocolo de avaliação da função mitocondrial em Oroboros O₂K

Feixes de fibras permeabilizadas foram cuidadosamente transferidas para papel de filtro e pesadas. De seguida, um feixe com 0.5-1 mg de peso húmido

foi transferido para cada câmara do respirómetro de alta resolução Oroboros O₂k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2.3 mL de meio de respiração mitocondrial MiR06 para avaliação da respiração mitocondrial. O protocolo de titulação de substrato-desacoplador-inibidor (SUIT)-014 O₂ pfi D042 foi utilizado para fibras cardíacas permeabilizadas a 37 °C, consistindo na adição sequencial de glutamato 10 mM, malato 10 mM, ADP 20 mM, citocromo C 5 µM, piruvato 10mM, succinato 20 mM, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) 0,5 µM, rotenona 1 µM, antimicina A 1 µM. A taxa e concentração de fluxo de oxigênio foram registadas e analisadas usando o software DatLab (Oroboros Datlab Versão 7.0, Oroboros Instruments Innsbruck, Áustria). O fluxo de oxigênio foi expresso em pmol.s⁻¹.mg⁻¹ (normalizado para o peso do feixe de fibras).

Como primeiro passo do protocolo SUIT-014 do Oroboros O₂k foi adicionado Glutamato e Malato, substratos que promovem o fornecimento de NADH para o complexo I e respetiva avaliação do estado LEAK (refere-se à respiração mitocondrial que ocorre quando o ATP não está a ser sintetizado); de seguida procedeu-se à adição de ADP para avaliação do estado OXPHOS pelo complexo I, identificando-se a atividade do estado OXPHOS – glutamato / malato (GM) (respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato); de seguida foi adicionado citocromo c, para testar a integridade da membrana externa mitocondrial; de seguida piruvato, mais um substrato para formação de NADH, registando-se a atividade do estado OXPHOS – glutamato / malato / piruvato (GMP) (respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato e piruvato); depois foi adicionado succinato, substrato que, metabolizado ao nível do complexo II (CII), promove a formação de flavina adenina dinucleótido hidrogenado (FADH₂), e respetiva avaliação do estado OXPHOS pelos complexos I+II (CI+II); seguidamente adição de CCCP, um desacoplador que é utilizado para avaliar a respiração máxima, também conhecida como capacidade ET (respiração não acoplada). A este propósito, e para evitar excessos na administração de CCCP que possam inibir a respiração, é crucial realizar titulações graduais para atingir a concentração ideal que permita obter o fluxo máximo. Após o CCCP, foi adicionada rotenona que é um inibidor do

complexo I, por isso, permite avaliar a funcionalidade isolada do complexo II; por fim, foi adicionada antimicina, um inibidor de CIII que permite avaliar o estado ROX (consumo residual de oxigênio). Após a realização de cada ensaio realizou-se uma lavagem cuidadosa do aparelho para evitar a contaminação por inibidores e desacopladores e possível comprometimento dos ensaios subsequentes.

Diariamente, antes da utilização do Oroboros O₂k, é realizada uma calibração “air” do aparelho e, antes da realização de cada protocolo, uma calibração “zero” e “background”.

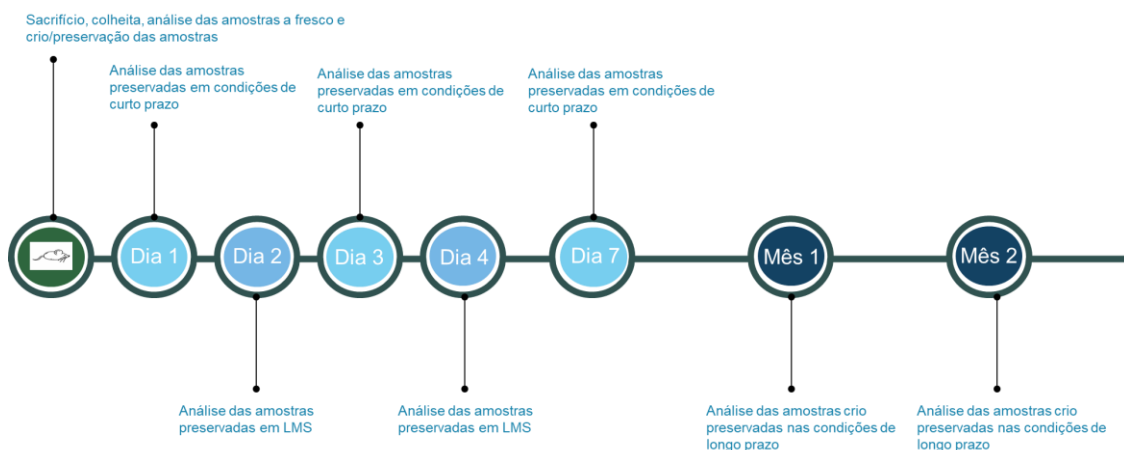


Figura 4 - Linha temporal das avaliações das amostras. Na figura pode-se observar o espaço temporal correspondente a cada avaliação das amostras, desde as amostras avaliadas a fresco, imediatamente após a colheita das mesmas, e para cada uma das diferentes condições, tanto as 1) condições de preservação a curto prazo, avaliadas 1,3 e 7 dias após a colheita, 2) as fatias de miocárdio vivas (LMS) resultante do protocolo MyoDish, avaliadas 2 e 4 dias após a colheita, e por último, as condições de longo prazo, avaliadas 1 e 2 meses após a colheita.

4.7. Teste de integridade da membrana externa (citocromo c)

A integridade da membrana mitocondrial é essencial para que as mitocôndrias funcionem corretamente. Quando a membrana está íntegra, a proteína denominada de citocromo c (cyt c), usada para o transporte de elétrons, permanece no espaço intermembranar da mitocôndria. No entanto, quando a membrana está danificada o citocromo c pode escapar para o citosol, prejudicando a cadeia de transporte de elétrons e a produção de ATP.

Quando administramos citocromo c exógeno durante a avaliação mitocondrial no Oroboros O₂k, e caso a membrana mitocondrial estiver danificada, esse citocromo c vai ser utilizado pela cadeia de transporte de elétrons, resultando num aumento do consumo de oxigénio. Este aumento é maior do que o observado após a administração de ADP, que normalmente estimula a respiração mitocondrial em membranas intactas.

Portanto, calculando a percentagem de integridade da membrana mitocondrial através da equação ((citocromo c - ADP)/ADP)×100, percebemos o aumento que houve com a administração do cit c em comparação com o aumento que houve quando foi administrado o ADP, sendo que, valores acima de 20% são sugeridos (Krajčová et al., 2020) como representativos de danos significativos na membrana mitocondrial externa.

$$\frac{cyt\ c - ADP}{ADP} \times 100 = >20\%$$
, sugere a existência de danos significativos na membrana externa mitocondrial.

4.8. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como um gráfico de dispersão com barra (média ± E.P.M.) do número de ratos indicados por grupo. O GraphPad Prism 9.0 foi usado para a elaboração gráfica e análise estatística. Após a identificação de *outliers* com o teste ROUT foi realizada a análise da distribuição Gaussiana com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA de duas vias, o teste ANOVA de uma via para comparações múltiplas (para uma distribuição Gaussiana) ou o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn (para uma distribuição não Gaussiana). Diferenças com um valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5. Resultados

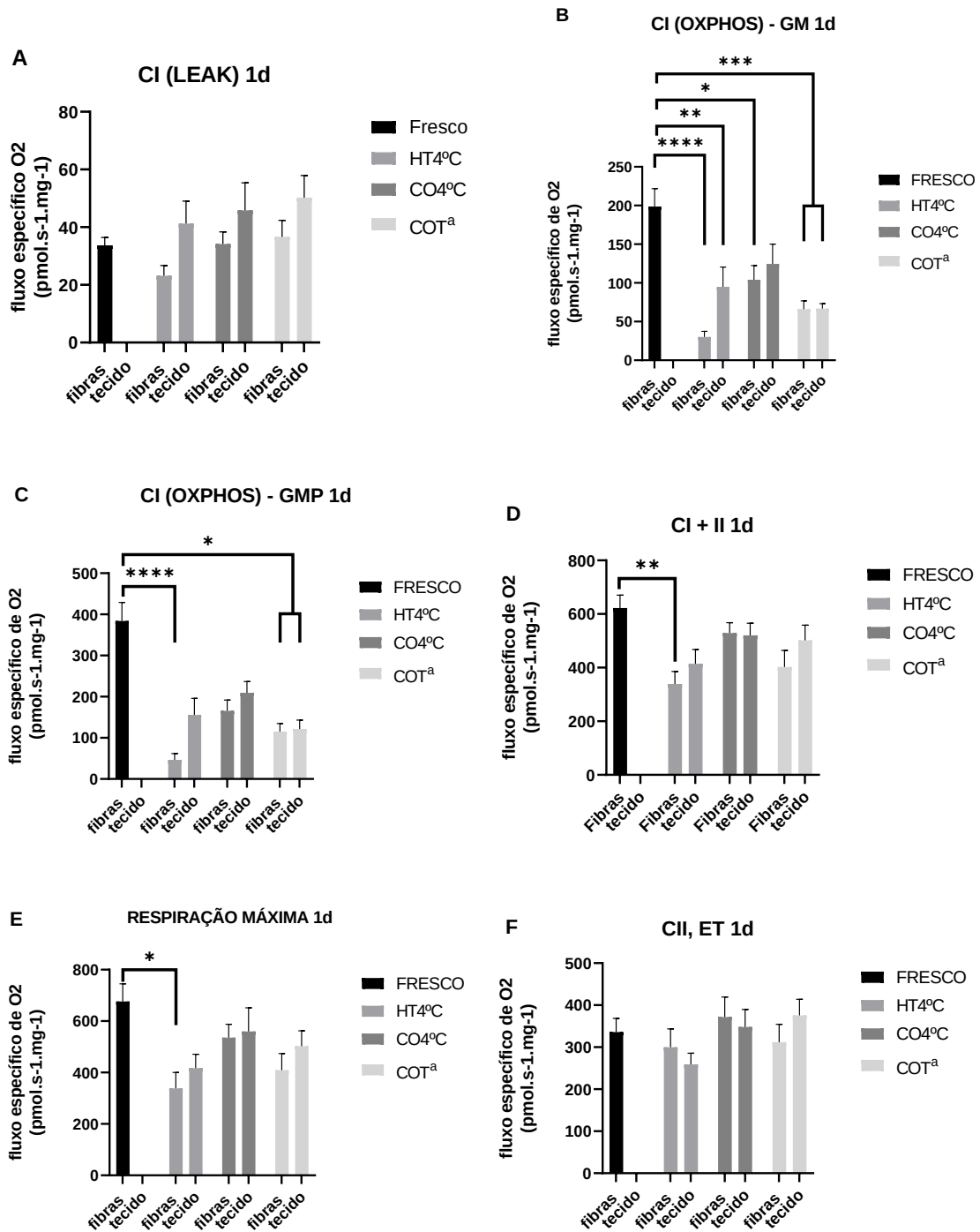
5.1. Amostras preservadas a curto prazo (CO e HT)

No presente estudo avaliámos a eficácia de soluções de preservação, nomeadamente o Custodiol (CO) e Hypothermosol (HT), e o impacto de diferentes temperaturas, na funcionalidade mitocondrial de amostras de tecido cardíaco.

As diferentes sub-imagens das figuras 5, 6 e 7 evidenciam o impacto da utilização do CO e do HT nas diferentes condições descritas na secção de métodos, nomeadamente a sua utilização em tecido ou fibras isoladas e a sua utilização após preservação a 4 °C (para o caso de ambas as soluções) ou a temperatura ambiente (T^a) (caso do CO). Estas diferentes possibilidades foram analisadas individualmente para cada um dos diferentes dias da linha temporal de preservação a curto prazo (ver figura 4).

Assim sendo, apresentamos de seguida os resultados para as seguintes condições: Custodiol 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas como fibras (CO4°C(f)), Custodiol 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas como tecido (CO4°C(t)); Custodiol temperatura ambiente utilizado em amostras previamente armazenadas como fibras (COT^a(f)); Custodiol temperatura ambiente utilizado em amostras previamente armazenadas como tecido (COT^a(t)); Hypothermosol 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas como fibras (HT4°C(f)); Hypothermosol 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas como tecido (HT4°C(t)).

5.1.1. Amostras avaliadas 1 dia após a colheita a fresco



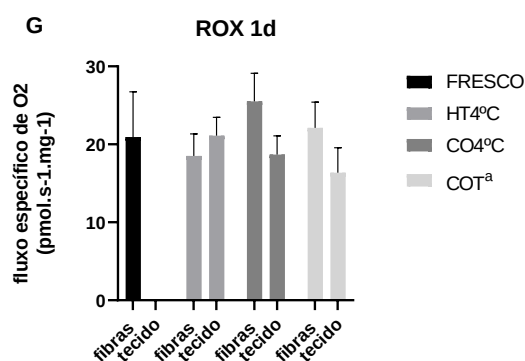


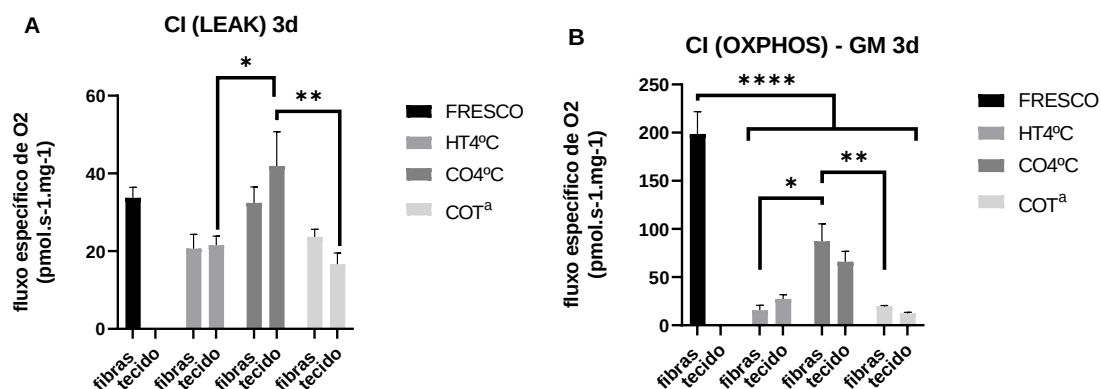
Figura 5 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 1º dia de armazenamento. Os gráficos representam a taxa mitocondrial de consumo de O₂ em função da energização dos diferentes complexos e em distintos estados em amostras preservadas com diferentes soluções (Hypothermosol a 4 °C, Custodiol a 4 °C e Custodiol T^a) após 1 dia de armazenamento prévio na forma de tecido ou fibras: (A) complexo I no estado LEAK, (B) complexo I no estado OXPHOS e adição de substratos para o complexo I, nomeadamente o glutamato e malato, (C) complexo I estado OXPHOS com a adição de glutamato, malato e piruvato, (D) complexo I+II, (E) respiração máxima, (F) ROX; Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, determinada pelo teste Kruskal-Wallis (A, G), ou por Ordinary One-Way ANOVA (B, C, D, E, F) de 5 a 6 amostras por grupo.

Abreviaturas: FRESCO, amostras avaliadas logo após a colheita; 1d, amostras avaliadas 1 dia após a colheita; CO4°C, amostras preservadas na solução de Custodiol a 4 °C; HT4°C, amostras preservadas na solução de Hypothermosol a 4 °C; COT^a, amostras preservadas na solução de Custodiol a temperatura ambiente; CI (LEAK), respiração mitocondrial energizada com substratos para o complexo I; CI (OXPHOS) – GM, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato e ADP; CI (OXPHOS) – GMP, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato, piruvato e ADP; CI+II, respiração em estado OXPHOS energizada com substratos para o complexo I e succinato para o complexo II; RM, respiração máxima induzida pelo desacoplador CCCP; CII, ET, respiração mitocondrial após adição de rotenona para inibir o complexo I; ROX, consumo residual de oxigénio após adição de antimicina para inibir o complexo III.

Como se pode perceber da figura 5, nos gráficos (A/F/G) não existem diferenças significativas, o que, por si só, sugere que não houve perda de funcionalidade mitocondrial nas diferentes condições relativamente à análise realizada a fresco. No entanto, no estado OXPHOS energizado com substratos para o CI (figura 5B), verificam-se diferenças significativas entre todas as

soluções de preservação, exceto com a solução Custodiol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenada em tecido e a amostra a fresco (HT4°C(f) vs fresco, $p<0,0001$; HT4°C(t) vs fresco, $p<0,01$; CO4°C(f) vs fresco, $p<0,05$; fresco vs COT^a(f)/(t), $p<0,001$). Na figura 5(C), após a adição de piruvato, observam-se diferenças significativas entre a amostra conservada em Hypothermosol a 4 °C e previamente armazenada em forma de fibras e as conservadas em Custodiol e armazenadas à temperatura ambiente e a amostra a fresco (HT4°C(f) vs fresco, $p<0,0001$; COT^a(f)/(t) vs fresco, $p<0,05$), sugerindo que a solução que manteve uma maior funcionalidade do complexo I foi o Custodiol a 4 °C, mais especificamente com as amostras previamente armazenadas na forma de tecido. Quando energizamos as amostras com substratos para o complexo II, na figura 5(D), identificam-se diferenças significativas apenas entre a amostra preservada em solução de Hypothermosol a 4 °C e previamente guardada na forma de fibras e a analisada a fresco ($p<0,01$), sugerindo que todas as outras soluções, não evidenciando diferenças significativas face aos resultados obtidos a fresco, se mostraram eficazes na manutenção da atividade destes dois complexos. No gráfico (E) da figura 6, observam-se apenas diferenças significativas entre a amostra preservada na solução de Hypothermosol a 4 °C e previamente armazenada na forma de fibras e a amostra avaliada a fresco ($p<0,05$), indicando que todas as outras soluções foram eficazes neste parâmetro.

5.1.2. Amostras avaliadas 3 dias após a colheita



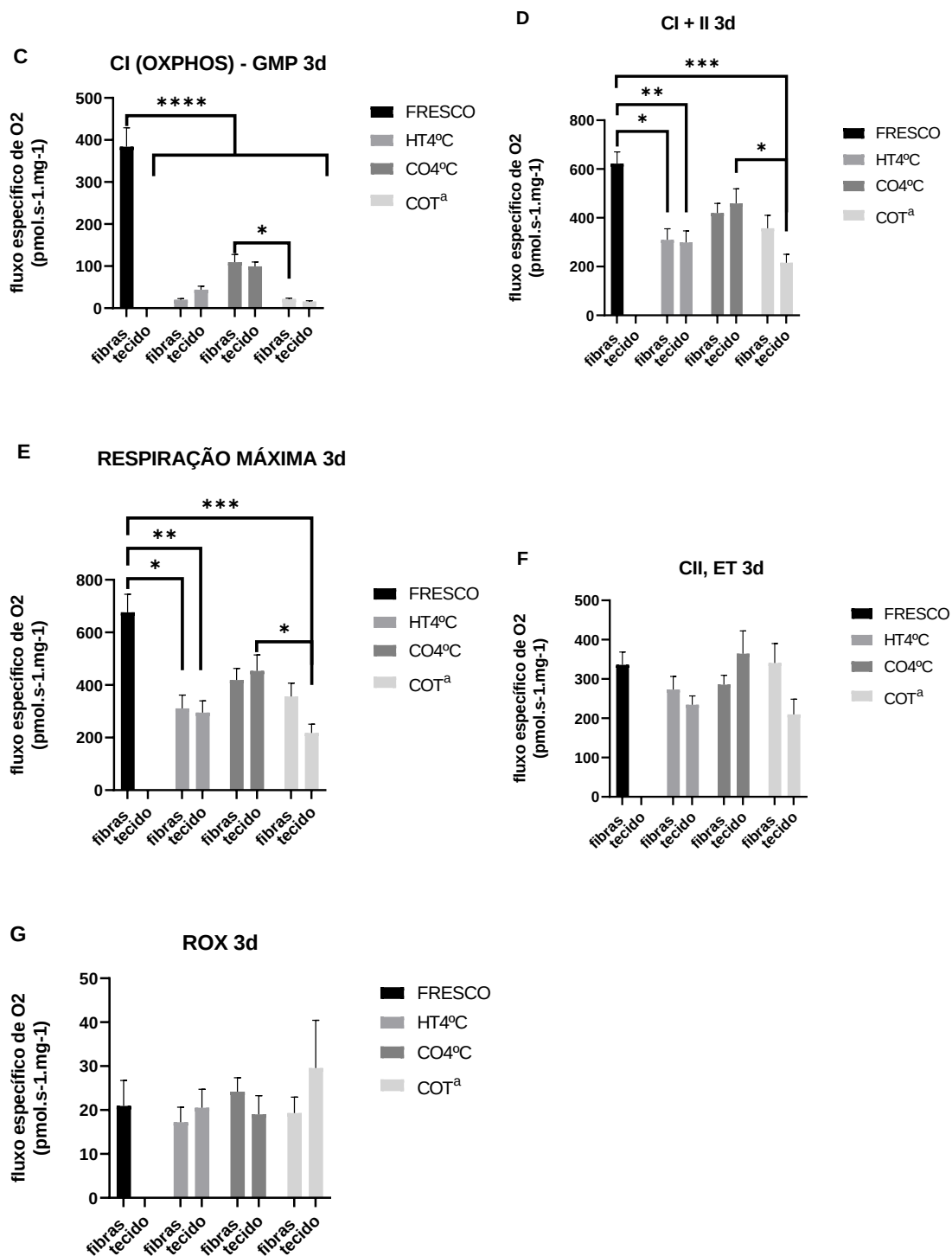


Figura 6 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 3º dia de armazenamento. Os gráficos representam a taxa mitocondrial de consumo de O₂ em função da energização dos diferentes complexos e em distintos estados em amostras preservadas com diferentes soluções (Hypothermosol a 4 °C, Custodiol a 4 °C e Custodiol T^a) após 3 dias de armazenamento prévio na forma de tecido ou fibras: (A) complexo I no estado LEAK, (B)

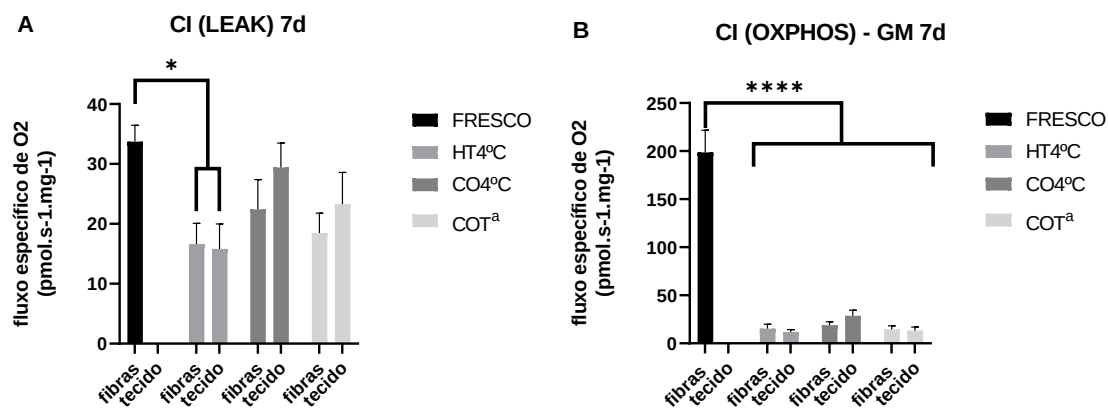
complexo I já no estado OXPHOS e adição de substratos de complexo I glutamato e malato, (C) complexo I estado OXPHOS com a adição de glutamato, malato e piruvato, (D) complexo I+II, (E) respiração máxima, (F) ROX; Significância estatística: $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$, determinada pelo teste Kruskal-Wallis (D, E), ou por Ordinary One-Way ANOVA (A, B, C, F) de 5 a 6 amostras por grupo.

Abreviaturas: FRESCO, amostras avaliadas logo após a colheita; 3d, amostras avaliadas 3 dias após a colheita; CO4°C, amostras preservadas na solução de Custodiol a 4 °C; HT4°C, amostras preservadas na solução de Hypothermosol a 4 °C; COT^a, amostras preservadas na solução de Custodiol a temperatura ambiente; CI (LEAK), respiração mitocondrial energizada com substratos para o complexo I; CI (OXPHOS) – GM, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato e ADP; CI (OXPHOS) – GMP, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato, piruvato e ADP; CI+II, respiração em estado OXPHOS energizada com substratos para o complexo I e succinato para o complexo II; RM, respiração máxima induzida pelo desacoplador CCCP; CII, ET, respiração mitocondrial após adição de rotenona para inibir o complexo I; ROX, consumo residual de oxigénio após adição de antimicina para inibir o complexo III.

O gráfico A da figura 6, reflete o impacto das diferentes condições experimentais no estado mitocondrial após energização com substratos para o complexo I. Como se pode perceber, verificam-se diferenças significativas entre as amostras preservadas em Custodiol a 4 °C e previamente armazenadas na forma de tecido e aquelas que foram preservadas na mesma solução à temperatura ambiente previamente armazenadas em tecido, ou com as que foram preservadas em Hypothermosol a 4 °C e armazenadas previamente em tecido (CO4°C(t) vs COT^a(t), $p<0,01$; CO4°C(t) vs HT4°C, $p<0,05$), traduzindo uma melhor eficácia das amostras quando preservadas na solução de CO4°C e previamente armazenadas como tecido. Nos gráficos (B/C), relativos à funcionalidade mitocondrial no estado OXPHOS após energização com diversos substratos para o complexo I, registam-se diferenças significativas entre todas as amostras preservadas em diferentes condições e a amostra avaliada a fresco ($p<0,0001$). Além disso, especificamente no gráfico (B), as amostras preservadas na solução de Custodiol a 4 °C e armazenadas na forma de fibras, demonstraram diferenças significativas face às condições HT4°C e COT^a (CO4°C(f) vs HT4°C(f), $p<0,05$; CO4°C(f) vs COT^a(f), $p<0,01$). No gráfico 6(C),

as amostras preservadas em Custodiol a 4 °C e armazenadas na forma de fibras, evidenciaram diferenças significativas comparativamente à armazenada a temperatura ambiente ($p<0,05$). Relativamente à figura 6(D), quando energizamos posteriormente as amostras com substratos para o complexo II (sucinato), observaram-se diferenças significativas comparativamente à resposta respiratória obtida com todas as soluções de preservação a não ser as que foram armazenadas em CO a 4° C e COT^a previamente armazenadas como fibras e as amostras a fresco (COT^a(t) vs fresco, $p<0,001$; HT4°C(t) vs fresco, $p<0,01$; HT4°C(f) vs fresco, $p<0,05$). Adicionalmente, a única solução de preservação que proporcionou diferenças significativas em relação às restantes foi Custodiol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas em tecido (CO4°C(t) vs COT^a(t), $p<0,05$). No gráfico (E), relativo à respiração máxima induzida pela utilização de um desacoplador (CCCP), a mesma tendência registada no estado anteriormente referido (6D) foi observada. Nos gráficos (F/G) da mesma figura não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes condições e a amostra a fresco.

5.1.3. Amostras avaliadas 7 dias após colheita



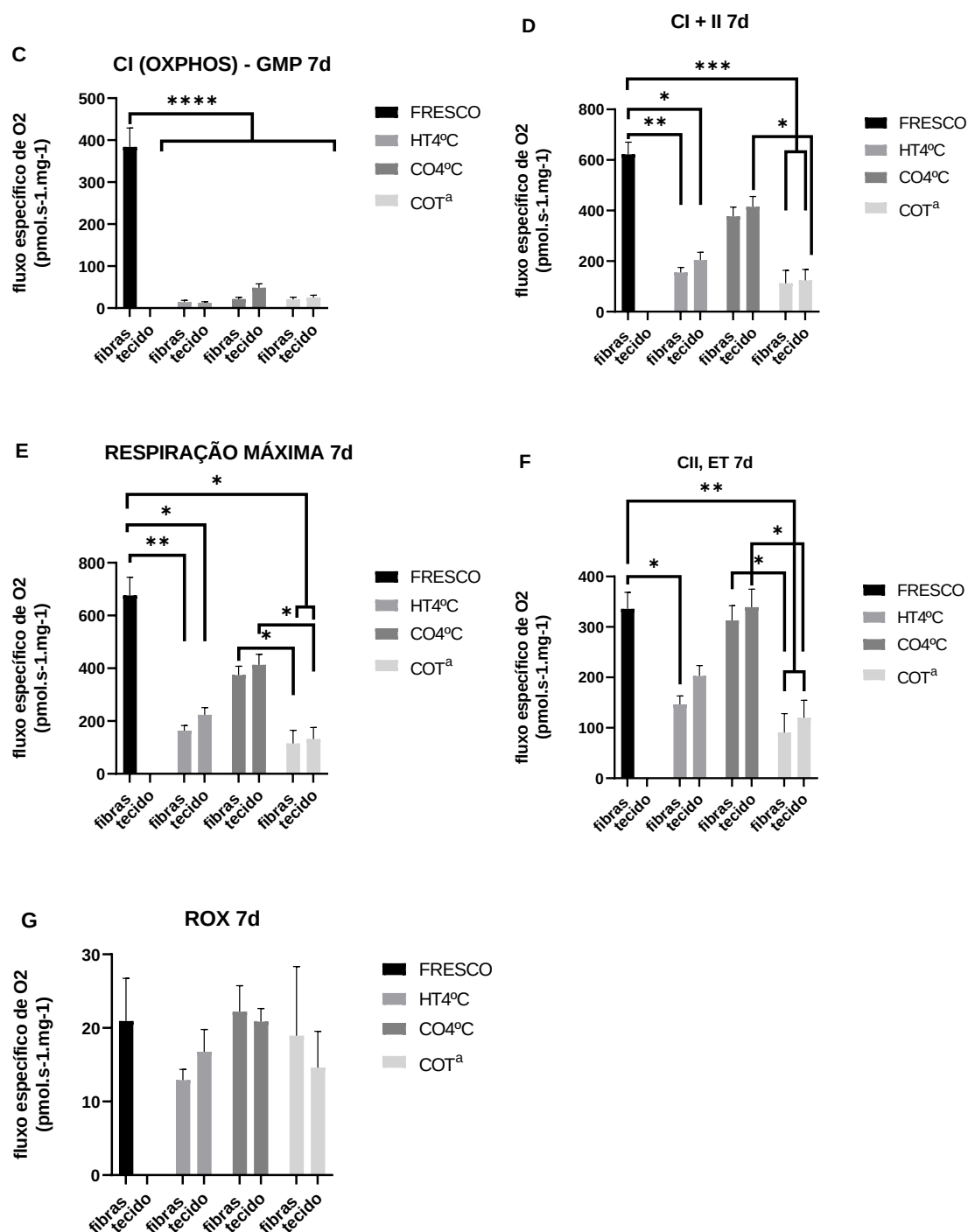


Figura 7 - Respiração mitocondrial nas condições de curto prazo a fresco e ao 7º dia de armazenamento. Os gráficos representam a taxa mitocondrial de consumo de O₂ em função da energização dos diferentes complexos e em distintos estados em amostras preservadas com diferentes soluções (Hypothermosol a 4 °C, Custodiol a 4 °C e Custodiol T^a) após 7 dias de armazenamento prévio na forma de tecido ou fibras: (A) complexo I no estado LEAK, (B) complexo I já no estado OXPHOS e adição de substratos de complexo I glutamato e malato, (C)

complexo I estado OXPHOS com a adição de glutamato, malato e piruvato, (D) complexo I+II, (E) respiração máxima, (F) ROX; Significância estatística: $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$, determinada pelo teste Kruskal-Wallis (A,D, E,F,G), ou por Ordinary One-Way ANOVA (B, C) de 5 a 6 amostras por grupo.

Abreviaturas: FRESCO, amostras avaliadas logo após a colheita; 7d, amostras avaliadas 7 dias após a colheita; CO4°C, amostras preservadas na solução de Custodiol a 4 °C; HT4°C, amostras preservadas na solução de Hypothermosol a 4 °C; COT^a, amostras preservadas na solução de Custodiol a temperatura ambiente; CI (LEAK), respiração mitocondrial energizada com substratos para o complexo I; CI (OXPHOS) – GM, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato e ADP; CI (OXPHOS) – GMP, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato, piruvato e ADP; CI+II, respiração em estado OXPHOS energizada com substratos para o complexo I e succinato para o complexo II; RM, respiração máxima induzida pelo desacoplador CCCP; CII, ET, respiração mitocondrial após adição de rotenona para inibir o complexo I; ROX, consumo residual de oxigénio após adição de antimicina para inibir o complexo III.

Relativamente aos resultados obtidos nas amostras preservadas durante 7 dias, podemos verificar no gráfico (A), relativamente ao estado LEAK, que apenas foram registadas diferenças significativas nas amostras preservadas a HT4°C comparativamente aos resultados a fresco (HT4°C(t)/(f) vs fresco, $p<0,05$). Já nos gráficos (B/C), relativos à respiração OXPHOS após energização com substratos específicos para o complexo I e adição de ADP, evidenciam-se diferenças significativas entre todas as condições de preservação e a amostra a fresco ($p<0,0001$). Quando energizamos as amostras com substratos para o complexo II, verificou-se, como se pode perceber no gráfico (D), que a solução Custodiol a 4°C foi a única que não motivou diferenças significativas em relação à amostra avaliada a fresco (COT^a(f)/(t) vs fresco, $p<0,001$; HT4°C(t) vs fresco, $p<0,01$; HT4°C(f) vs fresco, $p<0,05$). No estado de respiração máxima, obtido através de desacoplador (E), os resultados foram semelhantes aos anteriores, sendo de realçar, mais uma vez, que os obtidos nas amostras preservadas em Custodiol a 4 °C, quer previamente armazenadas na forma de tecido quer como fibras, não foram significativamente diferentes dos obtidos nas amostras a fresco (COT^a(f)/(t) vs fresco, $p<0,001$; HT4°C(f) vs fresco, $p<0,01$; HT4°C(t) vs fresco

$p < 0,05$; $CO4^{\circ}C(f)$ vs $COT^a(f)$, $p < 0,05$; $CO4^{\circ}C(t)$ vs $COT^a(t)$, $p < 0,05$). Quando inibimos a atividade do complexo I e examinamos o complexo II de forma isolada (7F), observaram-se diferenças significativas entre todas condições e a amostra a fresco com exceção das amostras preservadas em Custodiol a 4 °C, (tecido e fibras) e em Hypothermosol a 4° C (tecido) ($COT^a(f)/(t)$ vs fresco, $p < 0,01$; $HT4^{\circ}C(f)$ vs fresco, $p < 0,05$; $CO4^{\circ}C(f)$ vs $COT^a(f)$, $p < 0,05$; $CO4^{\circ}C(t)$ vs $COT^a(t)$, $p < 0,05$). Por último, no gráfico 7(G), não foram detetadas diferenças significativas entre as distintas condições.

Apresentamos seguidamente os resultados relativos à avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial através do teste de citocromo c nas condições de preservação a curto prazo.

Tabela 1 - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) nas condições de curto prazo, nomeadamente com a utilização de Hypothermosol ($HT4^{\circ}C$) e Custodiol (COT^a e $CO4^{\circ}C$) em tecido ou fibras isoladas armazenadas 1, 3 e 7 dias após a colheita. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs amostra a fresco, determinada pelo teste Ordinary One-Way ANOVA ($HT4^{\circ}C(f)$; $HT4^{\circ}C(t)$; $CO4^{\circ}C(t)$; $COT^a(f)$) ou pelo teste de Kruskal-Wallis ($CO4^{\circ}C(f)$; $COT^a(t)$), de 5 a 9 amostras por grupo.

Integridade mtOm (%)	fresco	1d	3d	7d
$HT4^{\circ}C(t)$	9.4 ± 2.1	20.4 ± 4.7	22.2 ± 8.3	25 ± 16.9
$HT4^{\circ}C(f)$	9.4 ± 2.1	8.7 ± 13.6	56.2 ± 42.1	30 ± 25.1
$CO4^{\circ}C(f)$	9.3 ± 2.1	24.9 ± 15.7	13.9 ± 4.9	74.5 ± 33.5 *
$CO4^{\circ}C(t)$	9.4 ± 2.1	25.9 ± 8.5	26.8 ± 8.5	27.3 ± 9.9
$COT^a(f)$	9.4 ± 2.1	57.6 ± 19.3	19.1 ± 7.6	96.7 ± 40.8
$COT^a(t)$	9.4 ± 2.1	39 ± 11.1	58.7 ± 15 *	108.3 ± 34.6 **

Abreviaturas: mtOm, *mitochondrial outer membrane*, membrana externa mitocondrial; LMS, *Living Myocardic Slides*, Fatias de Miocárdio Vivas; 2d, refere-se às amostras avaliadas 2 dias após a colheita; 4d, refere-se às amostras avaliadas 4 dias após a colheita.

Da análise da tabela 1, constata-se que só existem diferenças significativas comparativamente aos valores obtidos a fresco aquando da

utilização de CO₄°C em amostras previamente armazenadas como fibras ao dia 7 ($p<0,05$) e em amostras armazenadas em COT^a(t) ao dia 3 ($p<0,05$) e ao dia 7 ($p<0,01$). Tendo como referência que, neste teste de integridade de membrana, valores superiores a 20% sugerem danos significativos na membrana externa mitocondrial, verifica-se que, após 1 dia de armazenamento, as condições que se mostraram mais eficazes foram a HT4°C(f) e as HT4°C(t) e CO₄°C(f)/(t) com valores de integridade da membrana próximos dos valores de referência. Após 3 dias de armazenamento, a condição que mostrou ser mais eficaz foi a CO₄°C(f), seguida da condição COT^a(f). De realçar que as condições CO₄°C(t) e HT4°C(t) também parecem evidenciar uma certa eficácia na preservação da integridade da membrana. Após 7 dias de preservação, nenhuma condição proporcionou uma média inferior ou aproximada aos 20%, o que sugere que praticamente todas as amostras apresentaram danos significativos na integridade da membrana externa mitocondrial.

5.2. Amostras mantidas no sistema MyoDish (*Living Myocardial Slices* - LMS)

Relativamente às LMS de ventrículo direito (VD), mantidas no sistema MyoDish, durante 2 a 4 dias, são apresentados os resultados de respiração mitocondrial das análises a fresco e 2 e 4 dias após o seu armazenamento.

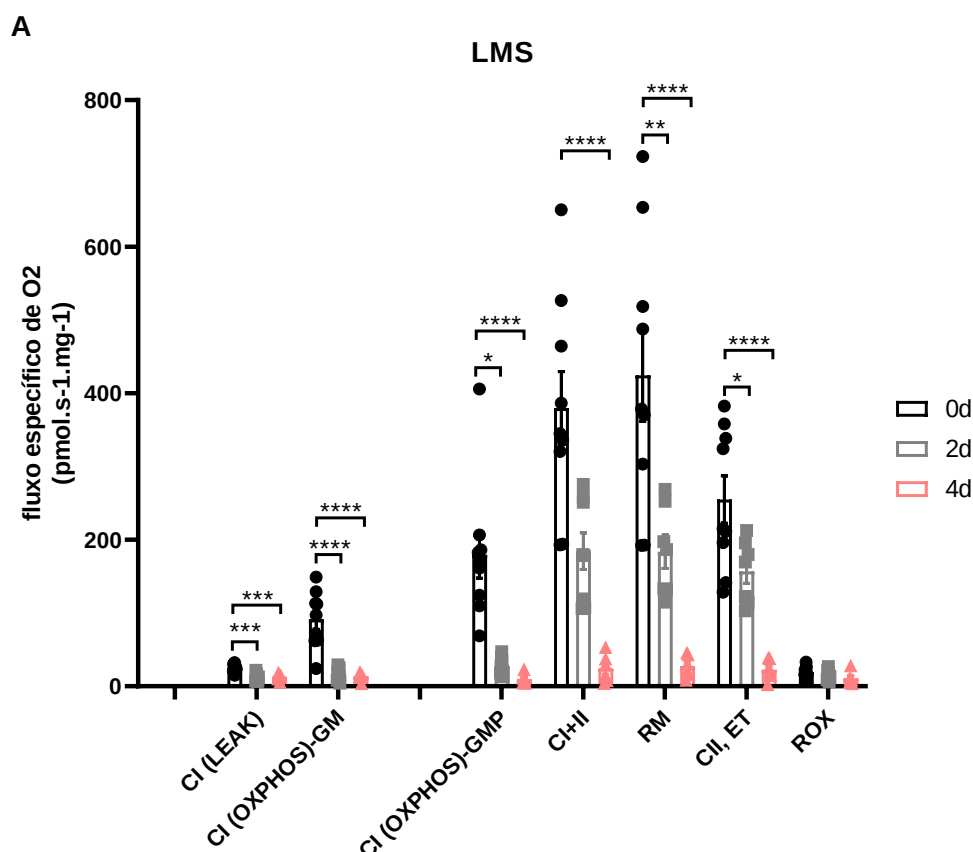


Figura 8 - Respiração mitocondrial das LMS a fresco e 2 e 4 dias após armazenamento. O gráfico representa a taxa mitocondrial de consumo de O₂ em função da energização dos diferentes complexos e em distintos estados em LMS mantidas no sistema MyoDish. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, determinada pelo teste Kruskal-Wallis, de 7 a 9 amostras por grupo.

Abreviaturas: 0d, FRESCO, refere-se às amostras avaliadas logo após a colheita; 2d, refere-se às amostras avaliadas 2 dias após a colheita; 4d, refere-se às amostras avaliadas 4 dias após a colheita; CI (LEAK), respiração mitocondrial energizada com substratos para o complexo I; CI (OXPHOS) – GMP, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato, piruvato e ADP; CI+II, respiração em estado OXPHOS energizada com substratos para o complexo I e succinato para o complexo II; RM, respiração máxima induzida pelo desacoplador CCCP; CII, ET, respiração mitocondrial após adição de rotenona para inibir o complexo I; ROX, consumo residual de oxigénio após adição de antimicina para inibir o complexo III.

A análise da figura 8 permite verificar diferenças significativas em todos os parâmetros, com exceção dos complexos I+II e o estado ROX, no dia 2 comparativamente à análise realizada a fresco (CI (OXPHOS) – GM, $p<0,0001$; CI (LEAK), $p<0,001$; RM, $p<0,01$; CI (OXPHOS) – GMP e CII, (ET), $p<0,05$). No que diz respeito aos resultados obtidos após 4 dias de armazenamento, só não se verificaram diferenças significativas relativamente às análises a fresco no estado ROX.

Os valores apresentados na tabela 2 expressam o cálculo da percentagem de integridade da membrana externa mitocondrial, realizados segundo o procedimento definido na secção de material e métodos e considerando que valores superiores a 20% sugerem a existência de danos significativos na membrana mitocondrial. A análise dos dados permite constatar que todas as amostras parecem apresentar a integridade da membrana mitocondrial sem danos significativos e sem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes momentos de avaliação.

Tabela 2 - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) de amostras LMS mantidas no sistema MyoDish a fresco e 2 e 4 dias após armazenamento. Significância estatística determinada pelo teste Ordinary One-Way ANOVA de 7 a 9 amostras por grupo.

Integridade mtOm (%)	fresco	2d	4d
LMS	15.4±4.2	12.3±5.2	16.1±14

Abreviaturas: mtOm, *mitochondrial outer membrane*, membrana externa mitocondrial; LMS = *Living Myocardic Slides*, Fatias de Miocárdio Vivas; 2d, refere-se às amostras avaliadas 2 dias após a colheita; 4d, refere-se às amostras avaliadas 4 dias após a colheita.

5.3. Amostras em condições de criopreservação (longo prazo)

As diferentes sub-imagens que compoem a figura 9 evidenciam o impacto da utilização de diferentes condições de criopreservação a longo prazo (1 e 2 meses de criopreservação) na funcionalidade mitocondrial de amostras de tecido cardíaco.

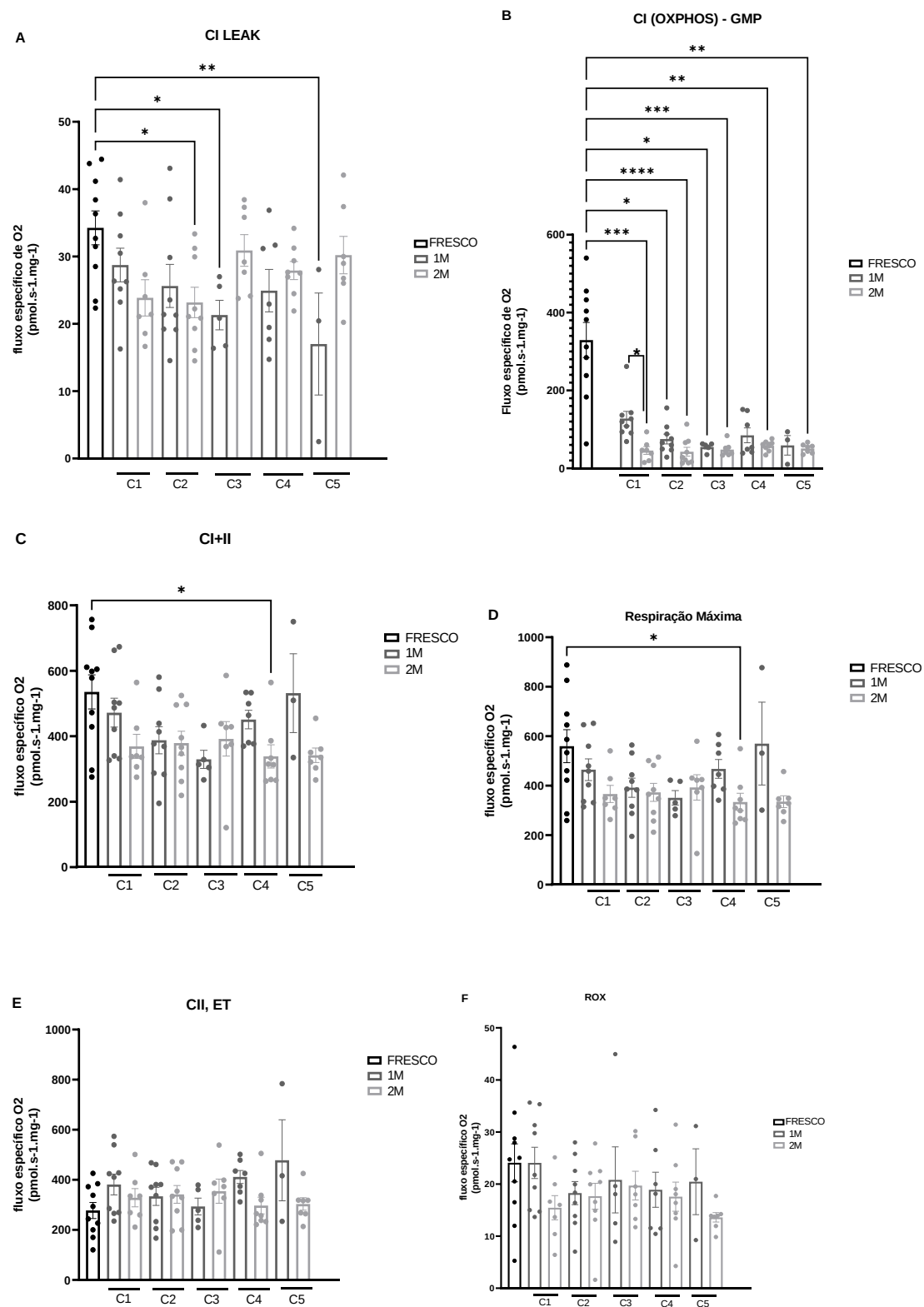


Figura 9 - Respiração mitocondrial em amostras sujeitas a diferentes condições de criopreservação a longo prazo. Os gráficos representam a taxa mitocondrial de consumo de O₂ em função da energização dos diferentes complexos e em distintos estados em amostras

sujeitas a condições distintas de criopreservação (Condição 1 (C1) - BIOPS/BSA/30%DMSO “congelamento instantânea”; Condição 2 (C2) - BIOPS/BSA/30%DMSO “congelamento sequencial”; Condição 3 (C3) - CO/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial”; Condição 4 (C4) - HT/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial”; Condição 5 (C5) - BIOPS/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial” após 1 e 2 meses de armazenamento. (A) complexo I no estado LEAK, (B) complexo I em estado OXPHOS com a adição de glutamato, malato e piruvato, (C) complexo I+II, (D) respiração máxima, (E) ROX; Significância estatística: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, determinada pelo teste Kruskal-Wallis (B, C, D, E), ou por Ordinary One-Way ANOVA (A, F) de 3 a 11 amostras por grupo.

Abreviaturas: FRESCO, refere-se às amostras avaliadas logo após a colheita; 1M, refere-se às amostras avaliadas 1 mês após a colheita; 2M, refere-se às amostras avaliadas 2 meses após a colheita; CI (LEAK), respiração mitocondrial energizada com substratos para o complexo I; CI (OXPHOS) – GM, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato e ADP; CI (OXPHOS) – GMP, respiração no estado de fosforilação oxidativa após a adição dos substratos de complexo I glutamato, malato, piruvato e ADP; CI+II, respiração em estado OXPHOS energizada com substratos para o complexo I e succinato para o complexo II; RM, respiração máxima induzida pelo desacoplador CCCP; CII, ET, respiração mitocondrial após adição de rotenona para inibir o complexo I; ROX, consumo residual de oxigênio após adição de antimicina para inibir o complexo III.

Analisando a atividade respiratória após adição de substratos do complexo I no estado LEAK (9A), constataram-se apenas diminuições significativas da função respiratória mitocondrial nas condições 2 ao 2º mês e 3 e 5 ao 1º mês em relação aos resultados obtidos na avaliação das amostras a fresco ($p<0,01$, $p<0,05$ e $p<0,05$, respectivamente). Na figura 9(B), representativa do estado OXPHOS com substratos energizantes do complexo I, observa-se que a condição 1 foi a única a apresentar uma diminuição significativa entre o mês 1 e o mês 2 ($p<0,05$), sendo que, em comparação com as amostras a fresco, só as condições 2 e 3 evidenciaram uma perda de funcionalidade significativa ($p<0,05$). Considerando o mês 2, todas as condições apresentaram diferenças significativas em relação à amostra a fresco (C2 vs fresco, $p<0,0001$; C1/C3 vs fresco, $p<0,001$; C4/C5 vs fresco, $p<0,01$). Relativamente aos gráficos (C/D), observa-se que somente a condição 4 no mês 2 propiciou alterações significativas da funcionalidade mitocondrial nestes estados relativamente às

amostras a fresco ($p<0,05$). No que diz respeito aos gráficos (E/F) da figura 9, não foram registradas diferenças significativas.

De seguida, são apresentados os resultados do teste de integridade da membrana externa mitocondrial, nas condições de criopreservação a longo prazo.

Tabela 3 - Avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial (mtOm) em diferentes condições de criopreservação a longo prazo (C1 - BIOPS/BSA/30%DMSO “congelamento instantânea”; C2 -BIOPS/BSA/30%DMSO “congelamento sequencial”; C3 - CO/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial”; C4- HT/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial”; C5 - BIOPS/BSA/10%DMSO “congelamento sequencial”) após 1 e 2 meses de armazenamento. Significância estatística: $*p<0,05$, $**p<0,01$, determinada pelo teste Ordinary One-Way ANOVA, de 3 a 9 amostras por grupo.

Integridade mtOm (%)	Fresco	1M	2M
Condição 1	8.5±1.8	25.1±7.7	30.2±7.5
Condição 2	8.5±1.8	21.9±4.4	14.5±5.5
Condição 3	9±2	36±12.3	25.5±8.7
Condição 4	9.1±1.7	13.7±4.9	25.9±6.4 *
Condição 5	8.2±2	53.4±11.1 *	43.7±6.2 **

Abreviaturas: mtOm, *mitochondrial outer membrane*, membrana externa mitocondrial; FRESCO, refere-se às amostras avaliadas logo após a colheita; 1M, refere-se às amostras avaliadas 1 mês após a colheita; 2M, refere-se às amostras avaliadas 2 meses após a colheita.

Analisando a tabela 3, verificam-se apenas diferenças estatisticamente significativas entre as condições 4 e 5 de criopreservação comparativamente com as amostras analisadas a fresco (C1 vs fresco mês 2, $p<0,05$; C5 vs fresco mês 1, $p<0,05$; C5 vs fresco mês 2, $p<0,01$).

Tendo como referência os valores apresentados na tabela 3, e considerando que valores acima de 20% sugerem danos significativos na membrana externa mitocondrial, pode-se constatar que, após 1 mês de armazenamento, foi a condição 4 que demonstrou melhor eficácia ainda que as condições 1 e 2 também pareçam ter proporcionado um razoável grau de proteção. Após 2 meses de armazenamento, a solução que mostrou ser mais eficaz foi a condição

2, ainda que as condições 3 e 4 tenham evidenciado, igualmente, uma certa eficácia na preservação da integridade da membrana.

6. Discussão

Neste estudo, de uma forma geral, observámos que 1) A solução de preservação a curto prazo que demonstrou maior eficácia na manutenção da função mitocondrial ao longo dos 7 dias foi o Custodiol a 4 °C. Genericamente, a preservação prévia das amostras na forma de tecido mostrou-se mais eficaz para a manutenção da função dos complexos I e II da cadeia de transporte de eletrões, embora a preservação na forma prévia de fibras tenha, igualmente, evidenciado benefícios em determinados momentos do armazenamento; 2) A solução de preservação que melhor manteve a integridade da membrana mitocondrial até ao 1º dia de armazenamento foi o Hypothermosol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas em fibras. No entanto, até aos 3 dias, foi o Custodiol a 4 °C utilizado em amostras previamente armazenadas como fibras que conseguiu manter um melhor nível de integridade. De destacar que as amostras armazenadas previamente na forma de fibras mostraram-se mais eficazes do que as armazenadas como tecido na preservação da integridade da membrana externa mitocondrial. No geral, as soluções de preservação demonstraram limitações significativas em manter a integridade da membrana externa mitocondrial ao longo do tempo. Contudo, relativamente às amostras do ventrículo direito, a preservação das LMS pelo sistema MyoDish mostrou-se eficaz na preservação da integridade da membrana externa mitocondrial. No entanto, apresentaram algumas limitações na manutenção da função dos complexos I e II; 3) Relativamente às condições de criopreservação a longo prazo, todas, com exceção da condição 1 ao 1º mês, evidenciaram dificuldades de manutenção da funcionalidade mitocondrial do complexo I em estado OXPHOS. Por outro lado, de uma forma geral, todas as condições conseguiram preservar a funcionalidade do complexo II e mesmo da respiração máxima, com exceção da condição 4 ao 2º mês; 4) Nas condições de criopreservação a longo prazo, a condição 2 foi a mais eficaz em manter a integridade das

amostras, embora todas as condições tenham evidenciado capacidade protetora da membrana externa.

6.1. Condições de preservação a curto prazo

Como foi referido inicialmente na “revisão da literatura”, diversos trabalhos têm sido realizados na tentativa de evidenciar propriedades protetoras de diferentes soluções face à deterioração estrutural e metabólica associada à preservação de órgãos e tecidos ao longo do tempo para efeitos de transplante ou análise posterior. No caso específico do Custodiol, também conhecido como solução de histidina-triptofano-cetoglutarato ou HTK, as suas propriedades termodinâmicas a baixas temperaturas têm sido atraentes para a cirurgia cardíaca menos invasiva, tal como para o uso na preservação de órgãos para transplante (Edelman et al., 2013), uma vez que parece ter um papel eficaz na capacidade de manter o equilíbrio osmótico e reduzir a formação de cristais de gelo nos respetivos tecidos. Em linha com estes resultados, os dados do presente trabalho, mostram que o Custodiol a 4 °C foi eficaz na manutenção da função mitocondrial a curto prazo. Comparando com outros estudos, que utilizam nomeadamente o mesmo tecido, a eficácia do Custodiol na preservação mitocondrial é consistente com a literatura existente (Edelman et al., 2013). Surpreendentemente, no que diz respeito à avaliação da integridade da membrana externa mitocondrial, a preservação das amostras nesta solução (CO4°C(f)) evidenciou um perfil temporal de proteção não esperado. Efetivamente, embora os valores obtidos no 3º dia sejam compatíveis com um nível de proteção adequado, valores inferiores a 20%, os níveis de integridade da membrana mitocondrial obtidos no dia 1 apresentam-se acima do limite de referência e, por isso, sugerem algum nível de dano. Este resultado não era esperado, uma vez que com o passar do tempo supor-se-ia que a amostra preservada ou mantivesse o nível de integridade ou o deterioramento da membrana fosse crescente. Uma razão plausível para o observado pode ter sido a existência de fatores externos à própria solução, nomeadamente a preparação prévia das fibras para armazenamento. De facto, uma vez que o mesmo se

evidenciou aquando da utilização de COT^{a(f)}, parece verificar-se uma tendência para que as amostras armazenadas previamente na forma de fibras, contrariamente ao que acontece com as armazenadas na forma de tecido, apresentem uma maior variabilidade e instabilidade temporal quanto à preservação da sua membrana externa mitocondrial ao longo do tempo. Hipoteticamente, este facto pode dever-se a problemas técnicos de preparação das fibras uma vez que, como se pode evidenciar no nosso trabalho, alguns dos resultados de integridade obtidos foram conseguidos com recurso a esta solução.

A este propósito, a forma prévia de armazenamento mostrou ser relevante e apresentar nuances nas condições de preservação a curto prazo. De facto, nestas condições de curto prazo, os dados parecem sugerir que o armazenamento em tecido preservou de forma mais eficaz a funcionalidade dos complexos I e II. No entanto, quanto à integridade da membrana externa, o armazenamento em fibras foi mais eficaz.

Por seu lado, o armazenamento hipotérmico durante 3 dias com Hypothermosol foi capaz de preservar significativamente a atividade metabólica, a integridade da matriz extracelular e células de culturas confluentes (Freitas-Ribeiro et al., 2019). Esta solução, rica em electrólitos, nutrientes essenciais e antioxidantes, proporciona um ambiente favorável ao funcionamento celular. No entanto, a utilização desta solução de preservação ao 7º dia evidenciou, no estudo anterior, menor capacidade protetora relativamente à diminuição da atividade metabólica celular o que vai, justamente, de encontro à diminuição da funcionalidade mitocondrial evidenciada no nosso trabalho. De facto, de acordo com os nossos resultados a eficácia protetora desta solução parece estar muito dependente do tempo, dissipando-se no decorrer do mesmo. Embora o hypothermosol seja eficaz na preservação a curto prazo da integridade da membrana externa mitocondrial, parece não fornecer a proteção necessária para a manutenção da funcionalidade do complexo I, mesmo que em certos momentos, tenha revelado alguma eficácia na preservação do complexo II. Tendo em conta que o complexo I possui estruturalmente muito mais subunidades do que o complexo II e que grande parte destas subunidades têm

funções estabilizadoras e de agregação, a potencial instabilidade crescente da membrana interna ao longo do tempo poderá, pelo menos em parte, contribuir para a diminuição da funcionalidade do complexo I (Caruana & Stroud, 2020; Figueroa et al., 2002; Hirst et al., 2003). Adicionalmente, o complexo I é mais sensível ao stress oxidativo comparativamente ao complexo II (Gröger et al., 2023; Guo et al., 2013; Wirth et al., 2016). De facto, uma significativa abundância de grupos ferro-enxofre no complexo I determinam uma elevada susceptibilidade à produção de ROS e consequentemente à lesão oxidativa tornando-o potencialmente menos funcional (Signorile & De Rasmio, 2023). Sendo o complexo I, contrariamente ao complexo II, responsável pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranar e, consequentemente, contribuidor efetivo gradiente protónico associada à produção de energia, a sua disfunção contribuirá, pelo menos em parte, para uma diminuição da bioenergética mitocondrial (Iverson et al., 2023; Sharma et al., 2009). De realçar, ainda, que o complexo I sendo altamente sensível ao stress oxidativo, pode “ver” exacerbada esta circunstância durante os processos de congelamento e descongelamento, tal como observado na secção seguinte relativa ao impacto de diferentes condições de criopreservação na funcionalidade mitocondrial.

As LMS são, recentemente, utilizadas como um modelo de complexidade cardíaca intermediária que fornecem uma plataforma de investigação *in vitro* representativa para estudos de cariz cardiovascular. A partir de uma variedade de modelos animais e biópsias humanas, este modelo de análise biológica, retêm a multicelularidade nativa, a arquitetura e a fisiologia do coração, e, ao mesmo tempo, possui uma espessura que garante difusão adequada de oxigénio e substrato metabólico *in vitro* (Watson et al., 2019). Em relação às amostras utilizadas no protocolo das LMS no nosso estudo, observou-se que a integridade da membrana externa mitocondrial foi preservada ao longo dos 4 dias de cultura. No entanto, apresentaram limitações substanciais na manutenção da função dos complexos I e II, o que sugere que, apesar deste protocolo conseguir preservar de forma eficaz a integridade da membrana externa mitocondrial, a bioenergética mitocondrial, ainda assim, está muito afetado.

6.2. Condições de criopreservação a longo prazo

A par da relevância do estudo da preservação de amostras biológicas e, neste nosso caso em particular, da funcionalidade mitocondrial em condições de curto prazo, existem variadas condições experimentais, no contexto da investigação, em que a possibilidade de criopreservar as amostras por períodos mais prolongados, recorrendo a métodos hipotérmicos de muito baixa temperatura, seria uma mais valia muito significativa (Jungare et al., 2022). Efetivamente, se isso já é possível para a análise de inúmeros parâmetros no âmbito das “ômicas”, de que a proteômica e a metabolômica são, desde há muito, exemplo, ainda não está adequadamente resolvida a possibilidade de analisar ou avaliar a funcionalidade de muitos componentes das amostras biológicas, algum tempo após a colheita. Efetivamente, a conservação de amostras a temperaturas muito baixas (p.e. -80 °C) parece ser um factor de stress biológico que determina em muitas condições a deterioração de alguns componentes celulares, como sejam as membranas e, conseqüentemente, a inviabilidade funcional da amostra (Jungare et al., 2022). Neste sentido, a aplicação de agentes crioprotetores antes do processo de congelação tem vindo a ser estudado como forma de mitigar esse efeito. Hipoteticamente, a par de outras vantagens, poderão ajudar a prevenir certas lesões mecânicas ou metabólicas induzidos pela formação de microcristais de gelo ou pela produção excessiva de ROS, respetivamente. No entanto, a utilização destes meios pode também prejudicar a estabilidade e função de diversas proteínas, a integridade das membranas celulares e, inclusivamente, mitocondriais (Marcantonini et al., 2022). Assim sendo, é necessário que estas soluções de criopreservação sejam aprimoradas para possuírem potencial de criopreservação com a máxima eficácia. No entanto, estudos no âmbito da criopreservação de tecidos para posterior análise de função mitocondrial são omissos e os resultados não são consensuais. Efetivamente, vários detalhes metodológicos associados aos tipos de tecido utilizados, à combinação e à proporção de diversos compostos utilizados, às temperaturas abaixo de zero utilizadas, bem como à forma como é

realizado o procedimento de congelação (imediato ou sequencial), parecem ditar diferentes respostas relativamente à viabilidade biológica das distintas amostras.

No presente trabalho, tal como referido anteriormente, de uma forma geral todas as condições testadas evidenciaram incapacidade de preservar a funcionalidade mitocondrial do complexo I em estado OXPHOS apesar de terem sido eficazes a preservar a funcionalidade do complexo II e mesmo da respiração máxima. Tendo como referência os compostos utilizados a curto prazo (Custodiol e Hypothermosol), verificamos que os mesmos não pareceram ser mais eficazes do que as restantes condições na preservação da funcionalidade mitocondrial apesar de, o HT na condição 4, se ter mostrado bastante eficaz na preservação da integridade de membrana, pelo menos ao 1º mês. Importa no entanto referir que nas condições em que estes dois compostos foram utilizados, a concentração de DMSO foi de 10%, em contraste com as condições 1 e 2 em que a sua concentração é de 30%. Relativamente a este aspecto, a estrita variação da concentração de DMSO entre a condição 2 (30%) e 5 (10%), parece sugerir que, ainda que no que diz respeito à funcionalidade mitocondrial não existam diferenças a assinalar, no teste de integridade de membrana uma maior concentração de DMSO parece ter efeitos mais protetores. Assim sendo, poderia ser uma via promissora, aumentar a percentagem de concentração de DMSO nas condições 3 e 4, de forma a incrementar o seu potencial crioprotetor. Em contraste (Nazarpour et al., 2012), sugerem que concentrações de DMSO superiores a 20% apresentam elevado nível de toxicidade celular e, por isso, comprometem a viabilidade biológica. Surpreendentemente, embora alguns estudos tenham demonstrado que o glicerol é menos tóxico que o DMSO (Tselutin et al., 1999), outros demonstram um potencial de criopreservação significativamente maior por parte deste (Kuznetsov et al., 2003), sugerindo que as concentrações entre 20% e 50% de DMSO, apresentam ter um efeito positivo na criopreservação de mitocôndrias de fibras musculares cardíacas e esqueléticas, apresentando um declínio acentuado na capacidade respiratória em concentrações maiores que 50%. Tendo em conta a complexidade de interações entre os diferentes compostos utilizados nas diferentes condições, hipoteticamente a potencial toxicidade do DMSO em altas concentrações, que

pode variar dependendo do tipo de célula ou tecido, deve ser levada em consideração em função da sua interação com os restantes componentes da solução (isto é, BSA e solução base de preservação) e modo de congelamento da amostra (Kuznetsov et al., 2003).

Com base nos resultados deste estudo, parece poder-se, ainda, concluir que o impacto do método de congelação é significativo quanto à viabilidade biológica das amostras. O processo de congelação instantânea demonstrou causar mais danos à membrana externa mitocondrial, como evidenciado pela comparação entre as condições 1 e 2, onde a única diferença foi o método de congelação (congelação instantânea vs congelação sequencial). De facto, na condição 2, a congelação sequencial resultou numa maior protecção membranar face ao obtido na condição 1 com congelação instantânea. Este facto parece ser corroborado pela literatura, que sugere que a velocidade de congelação pode influenciar significativamente a integridade celular durante a criopreservação (Heumüller-Klug et al., 2023). No entanto, quando se avalia outros parâmetros, como a funcionalidade de certos complexos, principalmente o complexo I até ao 1º mês de criopreservação, a condição 1, que seguiu o protocolo de congelação instantânea, foi aquela que se mostrou mais apta e eficaz a proteger a respiração mitocondrial apesar de, hipoteticamente, a toxicidade referida para as altas concentrações de DMSO poderem justificar a perda de eficiência no 2º mês. Adicionalmente, esta condição mostrou também ser eficaz na criopreservação das amostras até ao 2º mês relativamente à função respiratória do complexo II. Admitindo que ambos os métodos de congelação podem oferecer benefícios, dependendo dos respetivos modelos utilizados e de como são postos em prática (Heumüller-Klug et al., 2023; Levi-Setti et al., 2016), à partida sabe-se que no congelamento rápido, as amostras mudam do estado líquido para o sólido sem formação de cristais de gelo (Heumüller-Klug et al., 2023), mas que, por outro lado, tem um efeito desacoplador na respiração, danificando membranas mitocondriais (Larsen et al., 2012). Porventura, por esta razão, poderia requerer concentrações mais elevadas de DMSO e, de forma contraproducente, ter um impacto tóxico no tecido (Heumüller-Klug et al., 2023). Em alternativa, citoprotetores menos tóxicos, como o glicerol (Tselutin et al., 1999), permitiriam

um possível aumento da concentração sem comprometer o impacto tóxico no tecido.

Como exemplo final das implicações dos diferentes métodos de congelação na funcionalidade mitocondrial, foi demonstrado, em amostras de placenta, que a congelação rápida resultou numa diminuição severa do consumo de oxigénio, variando de ~30% no estado OXPHOS CI e CI+II a ~50% na capacidade máxima ET e CII, em comparação com as amostras avaliadas a fresco e criopreservadas gradualmente. Para além disso, a titulação de citocromo c aumentou a respiração em amostras congeladas rapidamente, o que sugere que penetrou o espaço intermembranar devido a danos na membrana externa (Giovarelli et al., 2023).

6.3. Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados do presente estudo sugerem a necessidade de adaptar protocolos para diferentes condições de criopreservação, visando melhorar a eficiência dos estudos futuros. Tendo em conta o atrás referido, sugere-se analisar a eficácia do glicerol, ou outro citoprotetor tido como menos tóxico em altas concentrações, substituindo o DMSO na condição 1 (BIOPS com 10 mg/ml BSA e 30% DMSO com “congelação instantânea”). Assim sendo, poder-se-ia testar um modelo de menor toxicidade a concentrações mais elevadas e manter a integridade da membrana.

Por outro lado, embora alguns estudos tenham demonstrado que o glicerol é menos tóxico que o DMSO (Tselutin et al., 1999), outros demonstram um potencial de criopreservação significativamente maior por parte deste (Kuznetsov et al., 2003). Por isso, tendo sido as condições 3 e 4 eficazes em manter a funcionalidade do complexo II, mas, no entanto, apresentarem dificuldade em manter a integridade da membrana externa, uma hipotética nova estratégia seria aumentar ligeiramente essa concentração para melhorar a integridade da membrana externa após a criopreservação.

Por último, visto que se observaram vantagens na preservação a curto prazo na forma de armazenamento prévio em tecido, apesar de o armazenamento prévio em fibras também ter evidenciado vantagens, seria

interessante replicar estes dois tipos de armazenamento também em condições de criopreservação a longo prazo.

7. Conclusão

O presente estudo apresentou como principal objetivo, avaliar a eficácia de diferentes soluções de preservação e criopreservação na manutenção da funcionalidade mitocondrial após armazenamento a curto e longo prazo, respetivamente.

Como conclusões gerais, poderemos salientar que:

- Relativamente ao efeito da preservação das amostras na funcionalidade mitocondrial do complexo I em estado OXPHOS até ao 3º dia, com exceção do CO4°C, utilizado em amostras previamente armazenadas na forma de tecido ou fibras, nenhuma outra condição foi claramente protetora;

- Relativamente ao efeito da preservação das amostras na funcionalidade mitocondrial do complexo II, o CO4°C é a solução que melhor preserva amostras, previamente armazenadas na forma de tecido ou fibras, de forma mais eficaz até ao 7º dia;

- Quanto à integridade da membrana externa mitocondrial, a metodologia mais eficaz foi a preservação das amostras na forma de LMS;

- Relativamente ao efeito da criopreservação das amostras na funcionalidade mitocondrial do complexo I em estado OXPHOS até ao 1º mês, a condição 1 foi a que se mostrou mais eficaz;

- Relativamente ao efeito da criopreservação das amostras na funcionalidade mitocondrial do complexo II em estado OXPHOS, todas as condições foram eficazes até ao 2º mês;

- Quanto à integridade da membrana externa mitocondrial, a condição 2 foi a que se mostrou mais eficaz.

Em suma, este trabalho não só alcançou os objetivos propostos, como também abriu novas vias para futuros trabalhos de investigação. Destaca-se a partir da sua realização a importância de continuar a explorar e otimizar as técnicas de preservação e criopreservação de amostras para avaliação da funcionalidade mitocondrial em diferentes contextos, nomeadamente nas áreas da saúde e do exercício físico.

8. Bibliografia

- Ahmad, M., Wolberg, A., & Kahwaji, C. I. (2024). *Biochemistry, Electron Transport Chain*.
- Austin, S., & St-Pierre, J. (2012). PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science*, 125(Pt 21), 4963–4971. <https://doi.org/10.1242/jcs.113662>
- Bian, X., Liu, R., Meng, Y., Xing, D., Xu, D., & Lu, Z. (2020). Lipid metabolism and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 218. <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>
- Bonanni, R., Cariati, I., Tarantino, U., D'Arcangelo, G., & Tancredi, V. (2022). Physical Exercise and Health: A Focus on Its Protective Role in Neurodegenerative Diseases. *Journal of functional morphology and kinesiology*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/jfmk7020038>
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287(4), C817-33. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Caruana, N. J., & Stroud, D. A. (2020). The road to the structure of the mitochondrial respiratory chain supercomplex. *Biochemical Society transactions*, 48(2), 621–629. <https://doi.org/10.1042/BST20190930>
- Casanova, A., Wevers, A., Navarro-Ledesma, S., & Pruimboom, L. (2023). Mitochondria: It is all about energy. *Frontiers in physiology*, 14, 1114231. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1114231>
- Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry*, 72, 77–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>
- Chastin, S. F. M., Abaraogu, U., Bourgois, J. G., Dall, P. M., Darnborough, J., Duncan, E., Dumortier, J., Pavón, D. J., McParland, J., Roberts, N. J., & Hamer, M. (2021). Effects of Regular Physical Activity on the Immune System, Vaccination and Risk of Community-Acquired Infectious Disease in the General Population: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 51(8), 1673–1686. <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01466-1>
- Cheng, C.-F., Ku, H.-C., & Lin, H. (2018). PGC-1 α as a Pivotal Factor in Lipid and Metabolic Regulation. *International journal of molecular sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113447>
- Cogliati, S., Cabrera-Alarcón, J. L., & Enriquez, J. A. (2021). Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochemical Society transactions*, 49(6), 2655–2668. <https://doi.org/10.1042/BST20210460>
- Doerrier, C., Garcia-Souza, L. F., Krumschnabel, G., Wohlfarter, Y., Mészáros, A. T., & Gnaiger, E. (2018). High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1782, 31–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3

- Dulguerov, F., Abdurashidowa, T., Christophel-Plathier, E., Ion, L., Gunga, Z., Rancati, V., Yerly, P., Tozzi, P., Albert, A., Ltaief, Z., Rotman, S., Meyer, P., Lefol, K., Hullin, R., & Kirsch, M. (2024). Comparison of HTK-Custodiol and St-Thomas solution as cardiac preservation solutions on early and midterm outcomes following heart transplantation. *Interdisciplinary cardiovascular and thoracic surgery*, 38(6).
<https://doi.org/10.1093/icvts/ivae093>
- Ebanks, B., Kwiecinska, P., Moiso, N., & Chakrabarti, L. (2023). A method to assess the mitochondrial respiratory capacity of complexes I and II from frozen tissue using the Oroboros O2k-FluoRespirometer. *PloS one*, 18(7), e0276147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276147>
- Edelman, J. J. B., Seco, M., Dunne, B., Matzelle, S. J., Murphy, M., Joshi, P., Yan, T. D., Wilson, M. K., Bannon, P. G., Vallely, M. P., & Passage, J. (2013). Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. *Annals of cardiothoracic surgery*, 2(6), 717–728.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2225-319X.2013.11.10>
- Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(10), 165845.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165845>
- Ferreira, R., Vitorino, R., Alves, R. M. P., Appell, H. J., Powers, S. K., Duarte, J. A., & Amado, F. (2010). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics*, 10(17), 3142–3154.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201000173>
- Figuerola, P., León, G., Elorza, A., Holuigue, L., Araya, A., & Jordana, X. (2002). The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 50(4–5), 725–734.
<https://doi.org/10.1023/a:1019926301981>
- Freitas-Ribeiro, S., Carvalho, A. F., Costa, M., Cerqueira, M. T., Marques, A. P., Reis, R. L., & Pirraco, R. P. (2019). Strategies for the hypothermic preservation of cell sheets of human adipose stem cells. *PloS one*, 14(10), e0222597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222597>
- Freitas-Ribeiro, S., Reis, R. L., & Pirraco, R. P. (2022). Long-term and short-term preservation strategies for tissue engineering and regenerative medicine products: state of the art and emerging trends. *PNAS nexus*, 1(4), pgac212. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac212>
- García-Roche, M., Casal, A., Carriquiry, M., Radi, R., Quijano, C., & Cassina, A. (2018). Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox biology*, 17, 207–212.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.008>
- Giovarelli, M., Serati, A., Zecchini, S., Guelfi, F., Clementi, E., & Mandò, C. (2023). Cryopreserved placental biopsies maintain mitochondrial activity for high-resolution respirometry. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 29(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00645-2>

- Grad, L. I., Sayles, L. C., & Lemire, B. D. (2005). Introduction of an additional pathway for lactate oxidation in the treatment of lactic acidosis and mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18367–18372. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506939102>
- Gröger, A., Martínez-Albo, I., Albà, M. M., Ayté, J., Vega, M., & Hidalgo, E. (2023). Comparing Mitochondrial Activity, Oxidative Stress Tolerance, and Longevity of Thirteen Ascomycota Yeast Species. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/antiox12101810>
- Gu, C., Yan, J., Zhao, L., Wu, G., & Wang, Y.-L. (2021). Regulation of Mitochondrial Dynamics by Aerobic Exercise in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 788505. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.788505>
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Di Nardo, M., Adiga, S. K., & Talevi, R. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 8(21), 2003–2014. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009>
- Harris, D. A., & Das, A. M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *The Biochemical journal*, 280 (Pt 3)(Pt 3), 561–573. <https://doi.org/10.1042/bj2800561>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Heumüller-Klug, S., Maurer, K., Tapia-Laliena, M. Á., Sticht, C., Christmann, A., Mörz, H., Khasanov, R., Wink, E., Schulte, S., Greffrath, W., Treede, R.-D., Wessel, L. M., & Schäfer, K.-H. (2023). Impact of cryopreservation on viability, gene expression and function of enteric nervous system derived neurospheres. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1196472. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1196472>
- Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., & Walker, J. E. (2003). The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1604(3), 135–150. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(03\)00059-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00059-8)
- Hood, D. A., Uguccioni, G., Vainshtein, A., & D'souza, D. (2011). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: implications for health and disease. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1119–1134. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100074>
- Irrcher, I., Adhihetty, P. J., Joseph, A.-M., Ljubicic, V., & Hood, D. A. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 33(11), 783–793. <https://doi.org/10.2165/00007256-200333110-00001>
- Iverson, T. M., Singh, P. K., & Cecchini, G. (2023). An evolving view of complex II-noncanonical complexes, megacomplexes, respiration, signaling, and

- beyond. *The Journal of biological chemistry*, 299(6), 104761.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104761>
- Jungare, K. A., Radha, R., & Sreekanth, D. (2022). Cryopreservation of biological samples – A short review. *Materials Today: Proceedings*, 51, 1637–1641.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.11.203>
- Kavazis, A. N., Morton, A. B., Hall, S. E., & Smuder, A. J. (2017). Effects of doxorubicin on cardiac muscle subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Mitochondrion*, 34, 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.10.008>
- Krajčová, A., Urban, T., Megvín, D., Waldauf, P., Balík, M., Hlavička, J., Budera, P., Janoušek, L., Pokorná, E., & Duška, F. (2020). High resolution respirometry to assess function of mitochondria in native homogenates of human heart muscle. *PloS one*, 15(1), e0226142.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226142>
- Kuznetsov, A. V., Kunz, W. S., Saks, V., Usson, Y., Mazat, J. P., Letellier, T., Gellerich, F. N., & Margreiter, R. (2003). Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. *Analytical Biochemistry*, 319(2), 296–303.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00326-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00326-9)
- Kwon, J. H., Moon, K. M., & Min, K.-W. (2020). Exercise-Induced Myokines can Explain the Importance of Physical Activity in the Elderly: An Overview. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 8(4).
<https://doi.org/10.3390/healthcare8040378>
- Larsen, S., Wright-Paradis, C., Gnaiger, E., Helge, J. W., & Boushel, R. (2012). Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function. *Cryo letters*, 33(3), 170–176.
- Lim, A. Y., Chen, Y.-C., Hsu, C.-C., Fu, T.-C., & Wang, J.-S. (2022). The Effects of Exercise Training on Mitochondrial Function in Cardiovascular Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012559>
- Liu, L., Li, Y., Chen, G., & Chen, Q. (2023). Crosstalk between mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain mitochondrial homeostasis. *Journal of biomedical science*, 30(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00975-7>
- Long, Q., Huang, L., Huang, K., & Yang, Q. (2019). Assessing Mitochondrial Bioenergetics in Isolated Mitochondria from Mouse Heart Tissues Using Oroboros 2k-Oxygraph. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1966, 237–246. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9195-2_19
- Marcantonini, G., Bartolini, D., Zatini, L., Costa, S., Passerini, M., Rende, M., Luca, G., Basta, G., Murdolo, G., Calafiore, R., & Galli, F. (2022). Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(10).
<https://doi.org/10.3390/molecules27103254>
- Memme, J. M., Erlich, A. T., Phukan, G., & Hood, D. A. (2021). Exercise and mitochondrial health. *The Journal of physiology*, 599(3), 803–817.
<https://doi.org/10.1113/JP278853>

- Mesquita, P. H. C., Vann, C. G., Phillips, S. M., McKendry, J., Young, K. C., Kavazis, A. N., & Roberts, M. D. (2021). Skeletal Muscle Ribosome and Mitochondrial Biogenesis in Response to Different Exercise Training Modalities. *Frontiers in physiology*, 12, 725866. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.725866>
- Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, F., Dorn, G. W., Kitsis, R. N., Otsu, K., Ping, P., Rizzuto, R., Sack, M. N., Wallace, D., Youle, R. J., & American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, C. on C. C. and C. on F. G. and T. B. (2016). Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation research*, 118(12), 1960–1991. <https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000104>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nazarpour, R., Zabihi, E., Alijanpour, E., Abedian, Z., Mehdizadeh, H., & Rahimi, F. (2012). Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMcs) Cryopreservation. *International journal of molecular and cellular medicine*, 1(2), 88–93.
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox biology*, 37, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Oliveira, A. N., Richards, B. J., Slavin, M., & Hood, D. A. (2021). Exercise Is Muscle Mitochondrial Medicine. *Exercise and sport sciences reviews*, 49(2), 67–76. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000250>
- Petrenko, Y., Chudickova, M., Vackova, I., Groh, T., Kosnarova, E., Cejkova, J., Turnovcova, K., Petrenko, A., Sykova, E., & Kubinova, S. (2019). Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem cells international*, 2019, 5909524. <https://doi.org/10.1155/2019/5909524>
- Pinckard, K., Baskin, K. K., & Stanford, K. I. (2019). Effects of Exercise to Improve Cardiovascular Health. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 6, 69. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00069>
- Pinna, S., Kunz, C., Halpern, A., Harrison, S. A., Jordan, S. F., Ward, J., Werner, F., & Lane, N. (2022). A prebiotic basis for ATP as the universal energy currency. *PLoS biology*, 20(10), e3001437. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001437>
- Posadzki, P., Pieper, D., Bajpai, R., Makaruk, H., Könsgen, N., Neuhaus, A. L., & Semwal, M. (2020). Exercise/physical activity and health outcomes: an overview of Cochrane systematic reviews. *BMC public health*, 20(1), 1724. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09855-3>
- Reisman, E. G., Hawley, J. A., & Hoffman, N. J. (2024). Exercise-Regulated Mitochondrial and Nuclear Signalling Networks in Skeletal Muscle. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 54(5), 1097–1119. <https://doi.org/10.1007/s40279-024-02007-2>

- Roberts, F. L., & Markby, G. R. (2021). New Insights into Molecular Mechanisms Mediating Adaptation to Exercise; A Review Focusing on Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Function, Mitophagy and Autophagy. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102639>
- Rossmann, M. P., Dubois, S. M., Agarwal, S., & Zon, L. I. (2021). Mitochondrial function in development and disease. *Disease models & mechanisms*, 14(6). <https://doi.org/10.1242/dmm.048912>
- San-Millán, I. (2023). The Key Role of Mitochondrial Function in Health and Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040782>
- Seo, D. Y., Ko, J. R., Jang, J. E., Kim, T. N., Youm, J. B., Kwak, H.-B., Bae, J. H., Kim, A. H., Ko, K. S., Rhee, B. D., & Han, J. (2019). Exercise as A Potential Therapeutic Target for Diabetic Cardiomyopathy: Insight into the Underlying Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246284>
- Severinsen, M. C. K., & Pedersen, B. K. (2020). Muscle-Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocrine Reviews*, 41(4), 594-609. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa016>
- Sharma, L. K., Lu, J., & Bai, Y. (2009). Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current medicinal chemistry*, 16(10), 1266-1277. <https://doi.org/10.2174/092986709787846578>
- Signorile, A., & De Rasmo, D. (2023). Mitochondrial Complex I, a Possible Sensible Site of cAMP Pathway in Aging. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020221>
- Singh, B., Olds, T., Curtis, R., Dumuid, D., Virgara, R., Watson, A., Szeto, K., O'Connor, E., Ferguson, T., Eglitis, E., Miatke, A., Simpson, C. E., & Maher, C. (2023). Effectiveness of physical activity interventions for improving depression, anxiety and distress: an overview of systematic reviews. *British journal of sports medicine*, 57(18), 1203-1209. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2022-106195>
- So, B., Kim, H.-J., Kim, J., & Song, W. (2014). Exercise-induced myokines in health and metabolic diseases. *Integrative Medicine Research*, 3(4), 172-179. <https://doi.org/10.1016/J.IMR.2014.09.007>
- Song, M., Mihara, K., Chen, Y., Scorrano, L., & Dorn, G. W. (2015). Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell metabolism*, 21(2), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.011>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 62(3), 341-360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Tselutin, K., Seigneurin, F., & Blesbois, E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry science*, 78(4), 586-590. <https://doi.org/10.1093/ps/78.4.586>
- Watson, S. A., Scigliano, M., Bardi, I., Ascione, R., Terracciano, C. M., & Perbellini, F. (2017). Preparation of viable adult ventricular myocardial

- slices from large and small mammals. *Nature protocols*, 12(12), 2623–2639. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.139>
- Watson, S. A., Terracciano, C. M., & Perbellini, F. (2019). Myocardial Slices: an Intermediate Complexity Platform for Translational Cardiovascular Research. *Cardiovascular drugs and therapy*, 33(2), 239–244. <https://doi.org/10.1007/s10557-019-06853-5>
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell transplantation*, 30, 963689721999617. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(7), 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.02.013>
- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Zanini, G., De Gaetano, A., Selleri, V., Savino, G., Cossarizza, A., Pinti, M., Mattioli, A. V., & Nasi, M. (2021). Mitochondrial DNA and Exercise: Implications for Health and Injuries in Sports. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102575>
- Zuccolotto-Dos-Reis, F. H., Escarso, S. H. A., Araujo, J. S., Espreadico, E. M., Alberici, L. C., & Sobreira, C. F. da R. (2021). Acetyl-CoA-driven respiration in frozen muscle contributes to the diagnosis of mitochondrial disease. *European journal of clinical investigation*, 51(9), e13574. <https://doi.org/10.1111/eci.13574>

