

Aplicação do peixe-zebra como modelo para a investigação das doenças mitocondriais

Use of zebrafish as a model for mitochondrial diseases research

Luís Ferreira^{1,3}, Mateus Laranjeira^{2,3}, Jorge M.A. Oliveira^{3,4}, Laura Vilarinho^{2,5}, Célia Nogueira^{2,5}

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

(1) Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(3) Unidade de Biociências Moleculares Aplicadas. Laboratório de Mitocôndria e Neurobiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(4) Laboratório Associado i4HB – Instituto para a Saúde e Bioeconomia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Unidade de Rastreo Neonatal. Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

As doenças mitocondriais (DM) constituem um grupo heterogéneo de doenças hereditárias do metabolismo resultantes de uma deficiente produção de energia causada por mutações no DNA mitocondrial ou nuclear. A sua complexidade genética, aliada à marcada variabilidade clínica, representa um desafio ao diagnóstico definitivo, sobretudo face à identificação frequente de variantes de significado incerto. O peixe-zebra (*Danio rerio*) surgiu como um modelo vertebrado de elevada relevância para o estudo da biologia mitocondrial, devido à sua conservação genética com o ser humano, desenvolvimento embrionário externo, transparência larvar e facilidade de manipulação genética. A aplicação de ferramentas de edição genética, como ZFNs, TALENs, CRISPR-Cas9 e sistemas de edição de base mitocondrial como o DdCBE, permite a modelação precisa de variantes patogénicas. Paralelamente, estratégias de silenciamento genético, incluindo morfólino e quimeras direcionadas ao genoma mitocondrial, possibilitam a modulação temporária e específica da expressão genética. A integração destas abordagens com metodologias de avaliação bioenergética e com linhas transgénicas *reporter* direcionadas à mitocôndria permite a monitorização funcional *in vivo* de parâmetros como estado redox, níveis de ATP, cálcio mitocondrial e mitofagia. Em conjunto, estas estratégias posicionam o peixe-zebra como uma plataforma translacional estratégica para a validação funcional de variantes e para o avanço da medicina de precisão nas DM.

_Abstract

Mitochondrial diseases (MD) comprise a heterogeneous group of inherited metabolic disorders resulting from impaired cellular energy production, caused by alterations in either mitochondrial DNA or nuclear. Their genetic complexity, combined with marked clinical variability, represents significant diagnostic challenges, particularly due to the frequent identification of variants of unknown significance. Zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a highly important vertebrate model for the study of mitochondrial biology, owing to its strong genetic conservation with humans, external embryonic development, larval transparency, and amenability to genetic manipulation. The application of genome editing tools, including ZFNs, TALENs, CRISPR-Cas9, and mitochondrial base editing systems such as DdCBE, enables precise modelling of pathogenic variants. In parallel, gene-silencing strategies,

including morpholinos and chimeras directed to the mitochondrial genome, allow transient and specific modulation of gene expression. The integration of these approaches with bioenergetic assessment methodologies and mitochondria-targeted transgenic reporter lines enables real-time *in vivo* functional monitoring of parameters such as redox state, ATP levels, mitochondrial calcium, and mitophagy. Collectively, these strategies position zebrafish as a strategic translational platform for functional variant validation and for advancing precision medicine in MD.

_Doenças mitocondriais

As mitocôndrias são organelos celulares dinâmicos, presentes no citoplasma das células eucarióticas, onde desempenham um papel fundamental na produção de energia, sendo a fosforilação oxidativa (OXPHOS) responsável pela produção de aproximadamente 90% do ATP celular. No entanto, coordenam também múltiplas vias metabólicas essenciais, como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a oxidação dos ácidos gordos, a cetogénese, o ciclo da ureia e a gluconeogénese (1).

As Doenças mitocondriais (DM) integram um grupo heterogéneo de doenças hereditárias do metabolismo (DHM), caracterizadas pela deficiência na produção de ATP através da OXPHOS. Estas doenças raras podem surgir em qualquer idade, sendo mais frequentes em crianças, e podem ser causadas por defeitos genéticos quer no DNA mitocondrial (mtDNA) quer no DNA nuclear (nDNA), afetando predominantemente tecidos com elevada exigência energética, como o cérebro, o coração e o músculo esquelético (2).

Estima-se que estas doenças afetem aproximadamente 1 em cada 5000 indivíduos, tornando-as numa das formas mais comuns de DHM (3). Doentes com mutações no nDNA apresentam tipicamente maior morbidade e mortalidade do que aqueles com mutações no mtDNA, e frequentemente apresentam manifestações clínicas mais precoces (nos primeiros anos de vida), uma progressão mais rápida da doença e uma maior manifestação multissistémica (4). Por outro lado, as mutações no mtDNA manifestam-se frequentemente sob a forma de heteroplasmia, ou seja, com coexistência de genomas mitocondriais normais e mutados nas células do doente, e cuja proporção ditará a expressão fenotípica e a gravidade de doença (5).

_DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial humano é composto por uma molécula de DNA circular de cadeia dupla que totaliza 16569 pares de bases. Este genoma codifica 37 genes: 13 codificam proteínas fundamentais para a OXPHOS e integram os complexos da cadeia respiratória (I, III, IV e V), e 24 codificam proteínas dedicadas à maquinaria de síntese proteica: 22 RNAs de transferência (tRNAs) e 2 RNAs ribossómicos (rRNAs) (figura 1) (6). Contudo, o funcionamento deste organelo depende fortemente do núcleo, uma vez que cerca de 1500 proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear e importadas para a mitocôndria após a sua síntese citoplasmática (7).

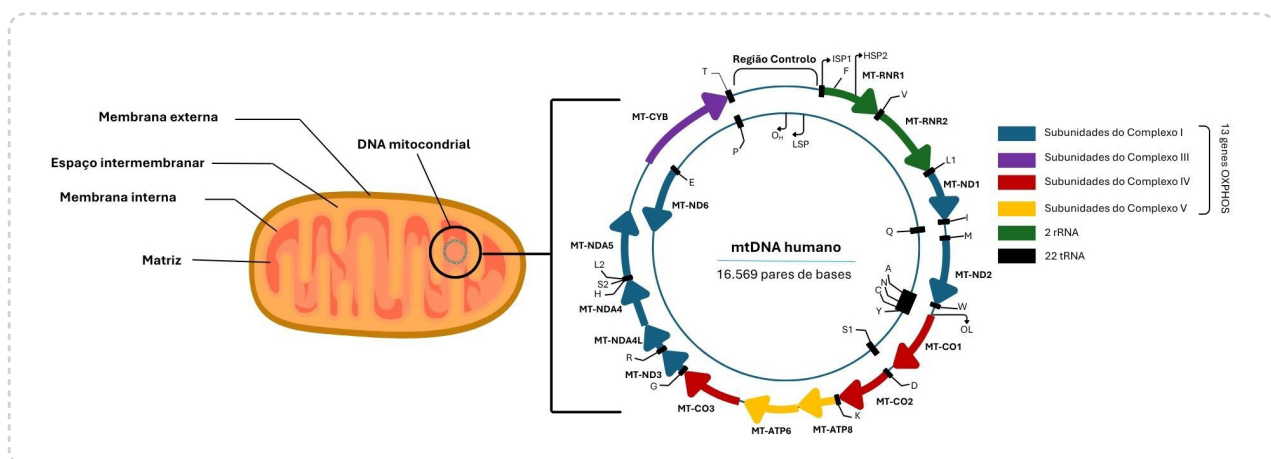
_DNA nuclear

O nDNA desempenha um papel fundamental na biologia da mitocôndria, uma vez que a grande maioria das proteínas necessárias ao funcionamento da mitocôndria são codificadas pelo genoma nuclear. Estas proteínas são sintetizadas no citosol e posteriormente importadas para a mitocôndria através de complexos translocadores especializados localizados nas membranas mitocondriais externa e interna. Consequentemente, mutações nos genes nucleares podem comprometer múltiplos processos essenciais para a função mitocondrial, sendo que, atualmente, mais de 400 genes nucleares foram associados a DM (2). A maioria destas mutações segue um padrão de hereditariedade de Mendel, frequentemente autosómico recessivo, e tende a manifestar-se precocemente na infância (4).

_Potencial do peixe-zebra na investigação das doenças mitocondriais

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo amplamente utilizado no estudo da biologia mitocondrial, devido à elevada conservação de proteínas mitocondriais em relação aos mamíferos (8). Análises comparativas com o genoma de referência humano indicam que cerca de 70% dos genes humanos encontram, pelo menos, um ortólogo correspondente no peixe-zebra. Para além desta relevância genética, o peixe-zebra oferece vantagens experimentais importantes, incluindo ele-

Figura 1: Estrutura da mitocôndria e organização do genoma mitocondrial humano.



vada fecundidade, rápido desenvolvimento e embriões transparentes com desenvolvimento externo, características que facilitam estudos de imagem *in vivo* e a análise funcional da mitocôndria após manipulação genética (9).

No entanto, ao contrário dos humanos e da maioria dos vertebrados, cerca de 20% do genoma do peixe-zebra passou por um evento de duplicação, originando um ou mais parálogos. Essa duplicação pode dar origem a mecanismos compensatórios após modificações genéticas, o que por vezes mascara fenótipos observáveis (10).

_Estratégias de manipulação genética em peixe-zebra

Atualmente, existem diversas abordagens de manipulação genética para estudos em peixe-zebra, que se dividem fundamentalmente entre a edição e o silenciamento (*knockdown*) genético. A edição genética visa a introdução de alterações permanentes e hereditárias na sequência de DNA, sendo ideal para a criação de linhagens mutantes estáveis. Dentro desta categoria, as nucleases de “dedos de zinco” (ZFNs) e as nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) utilizam a nuclease FokI para cortar o DNA em locais específicos, forçando a célula a ativar mecanismos de reparação que podem silenciar genes ou introduzir novas sequências (11). Atualmente, a técnica de eleição para edição genética é o CRISPR-Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas), onde é utilizada uma endonuclease (Cas9) em conjunto com uma molécula de RNA guia (*single-guide* RNA: sgRNA) para introduzir quebras no DNA. Esta simplicidade de *design* permite a edição eficiente e simultânea de múltiplos genes, com custos e tempo de execução reduzidos (12).

Uma técnica emergente recorre à geração de mutantes F0 por CRISPR-Cas9, geralmente designados *crispants*. Esta abordagem baseia-se na injeção de três ou mais sgRNAs, promovendo a formação de alelos de perda de função em mosaico na geração F0. As consequências fenotípicas dessas alterações podem ser analisadas diretamente nos primeiros dias dos embriões injetados, constituindo uma alternativa eficaz à utilização de morfolinós (MOs), enquanto não são estabelecidas linhas estáveis (13,14).

Por outro lado, o silenciamento genético atua ao nível do RNA e reduz apenas temporariamente a expressão proteica, sem alterar a sequência genética original. Uma das técnicas é a interferência de RNA (RNAi), que utiliza *short interfering* RNAs (siRNAs) ou *short hairpin* RNAs (shRNAs) para degradar o mRNA alvo ou reprimir a sua tradução. Contudo, a aplicação de RNAi em embriões de *zebrafish* tem demonstrado eficácia limitada e alta variabilidade fenotípica quando comparada com outros modelos animais, devido a dificuldades de toxicidade inespecífica (15). Em contrapartida os MOs permanecem como uma ferramenta de referência para o silenciamento temporário. São análogos sintéticos de ácidos nucleicos que se ligam ao RNA mensageiro alvo, bloqueando a expressão dessa mesma sequência (16). Apesar de serem necessários controlos rigorosos para verificar a toxicidade não específica, a sua utilização é particularmente vantajosa para estudos do desenvolvimento embrionário inicial ou a criação de modelos cujas técnicas de edição genética resultam em letalidade embrionária (17).

_Manipulação e análise funcional do genoma mitocondrial

Para direcionar mutações ao mtDNA são necessárias estratégias especiais, uma vez que as mitocôndrias são constituídas por uma membrana dupla, que é impermeável à maioria dos ácidos nucleicos exógenos, inviabilizando técnicas como o CRISPR-Cas9 ou silenciamento genético convencional. Assim, para garantir a entrada na matriz mitocondrial, tanto as técnicas mt-ZFNs como as mito-TALENs utilizam sequências com péptidos de direcionamento mitocondrial. No caso específico das mtZFNs, é ainda necessária a adição de um sinal de exportação nuclear para impedir que estas atuem no núcleo da célula (18). Estudos demonstram que ambas as técnicas são eficazes na alteração da heteroplasmia do mtDNA, resultando na recuperação fisiológica das células (19).

Atendendo às limitações do CRISPR-Cas9 na edição do genoma mitocondrial e ao carácter destrutivo das abordagens baseadas em ZFNs e TALENs, foi desenvolvida uma estratégia de edição genética sem indução de quebras de dupla cadeia. Este sistema, designado DdCBE (*DddA-derived cytosine base editor*), baseia-se numa citidina desaminase bacteriana

(DddA) dividida em duas subunidades inativas, fundidas a proteínas TALE, que recuperam atividade apenas após ligação à sequência alvo, permitindo a conversão específica de citosinas em timinas (20). Desenvolvimentos recentes aumentaram a eficiência e alargaram o espectro de sequências editáveis, possibilitando a modulação precisa e o estudo funcional de um conjunto mais amplo de variantes patogénicas mitocondriais (21).

Mais recentemente, foram desenvolvidas as quimeras de peptídeo-MO direcionadas às mitocôndrias (pCox4-MO), sendo concebidas para permitir o silenciamento específico e reversível da expressão de genes codificados pelo mtDNA. Estas quimeras combinam um MO com uma sequência peptídica de direção mitocondrial, possibilitando a sua importação para a mitocôndria e o bloqueio seletivo da tradução de mRNAs mitocondriais (22).

Todas as técnicas de manipulação genética anteriormente descritas estão resumidas na **tabela 1**.

Tabela 1: ⚡ Comparação entre técnicas de manipulação genética no peixe-zebra.

Técnica	Alvo	Permanente	Aplicação em mtDNA	Vantagens	Limitações	Referências
ZFNs	DNA	Sim	mtZFNs	Tamanho compacto; Fácil entrega via vetores virais	Alto risco de <i>off-targets</i> ; Complexidade no <i>design</i> das proteínas	(18)
TALENs	DNA	Sim	Mito-TALENs	Alta especificidade de edição e flexibilidade de alvos	Alto custo; Construção difícil e complexa; Tamanho molecular grande.	(18)
CRISPR-Cas9	DNA	Sim	Não	Simple, baixo custo e eficiente	Necessidade da sequência PAM (<i>protospacer adjacent motif</i>); Tempo prolongado para obtenção de linhas estáveis homocigóticas	(12)
CRISPR F0 (<i>crispants</i>)	DNA	Sim (mosaico)	Não	Avaliação fenotípica rápida; Dispensa linhagens estáveis	Mosaicismo; Variabilidade fenotípica; Possíveis mecanismos compensatórios	(14)
RNAi	RNA	Não	Não	Silenciamento pós-transcricional	Alta variabilidade fenotípica; Toxicidade inespecífica	(15)
Morfolinos	RNA	Não	pCox4-MO	Reversível; Rápido estabelecimento de modelos; Bloqueio de tradução ou <i>splicing</i>	Efeito transitório; Toxicidade <i>off-target</i>	(22,23)
DdCBE	DNA	Sim	Sim	Edição precisa, sem quebras de dupla cadeia; Alta eficiência	Limitado a conversões C•G → T•A; Dependência de contexto de sequência (motivo 5'-TC-3')	(21)

_Validação funcional de variantes de significado incerto

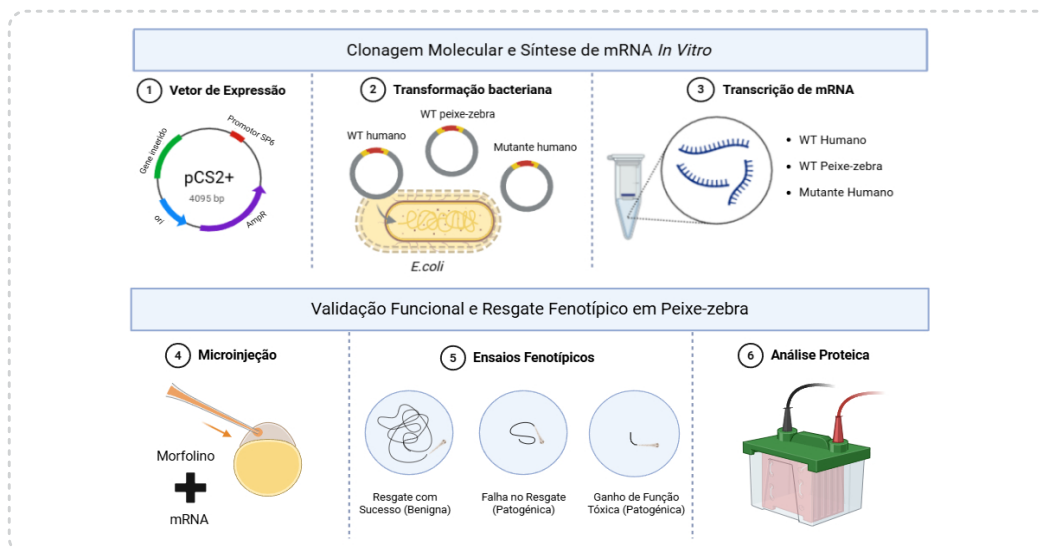
A utilização crescente de tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS) conduziu à identificação de um número significativo de variantes de significado incerto (VUS), cuja patogenicidade não pode ser determinada apenas com estudos em bases de dados bioinformáticas ou populacionais. Neste contexto, modelos experimentais tornam-se fundamentais para estabelecer uma ligação causal entre a variante genética e o fenótipo observado (2). Através de ensaios de resgate genético *in vivo*, com o peixe-zebra, torna-se possível introduzir variantes humanas em embriões geneticamente modificados, permitindo determinar, de forma precisa, a patogenicidade ou benignidade de variantes específicas suportando posteriormente a decisão clínica (24). Nestes ensaios, após induzirmos a perda de função de um gene com MO, injetamos nos embriões o mRNA normal desse gene humano. É crucial que estas microinjeções ocorram nos estágios iniciais (1 a 2 células) e que a avaliação fenotípica seja feita até às 48 horas pós-fertilização, devido à degradação natural do mRNA e à diminuição da proteína ao longo do desenvolvimento. Se o fenótipo normal for restaurado, confirmamos que a alteração observada foi devida especificamente à deficiência do gene em estudo. De seguida, testamos a variante identificada no doente, e se não se verificar

a recuperação do fenótipo normal, ou se, pelo contrário, se verificar um ganho de função tóxica, confirma-se o impacto funcional dessa variante. Esta evidência de disfunção fenotípica é crucial para fundamentar a classificação da VUS como patogénica. Complementarmente, podem-se também realizar ensaios ao nível da proteína para aumentar a fiabilidade dos resultados e validar o impacto funcional da VUS (figura 2) (25).

_Avaliação da função mitocondrial *in vivo*

Para validar o impacto funcional das manipulações descritas é crucial quantificar o metabolismo mitocondrial *in vivo*. Em peixe-zebra, esta avaliação recorre frequentemente a duas tecnologias complementares. A análise de fluxo extracelular (Seahorse XF) permite medir, em tempo real, o consumo de oxigénio e a produção de ATP, assim como parâmetros derivados como a capacidade respiratória máxima, a taxa de fuga de protões e a capacidade respiratória de reserva (26). Por outro lado, a respirometria de alta resolução (Oroboros O2k) possibilita uma caracterização bioquímica detalhada, isolando a atividade dos diferentes complexos da cadeia respiratória e identificando quais são responsáveis pelas alterações patológicas observadas. A combinação destas abordagens fornece uma visão funcional abrangente, conectando alterações bioenergéticas a fenótipos específicos (27).

Figura 2: Estratégia experimental para a validação funcional de VUS em peixe-zebra.



Esquema representativo das etapas de clonagem molecular, síntese de mRNA *in vitro* e microinjeção em embriões de peixe-zebra, seguido da avaliação fenotípica. A análise do resgate funcional permite distinguir variantes benignas, variantes patogénicas por perda de função e variantes patogénicas associadas a ganho de função tóxica, podendo ser complementada por análises proteicas.

_Linhas transgênicas *reporter* para monitorização mitocondrial *in vivo*

Para além das abordagens bioquímicas, o peixe-zebra permite a utilização de linhas transgênicas *reporter* direcionadas à mitocondria, possibilitando a monitorização dinâmica dos parâmetros funcionais em tempo real. Estes sistemas baseiam-se na expressão de proteínas fluorescentes em fusão com outras proteínas mitocondriais, permitindo avaliar diretamente o estado redox, a produção de ATP, a dinâmica mitocondrial ou o cálcio intramitocondrial. Entre os exemplos mais utilizados destaca-se a linha mito-roGFP2, sensível ao estado redox mitocondrial e que permite monitorizar alterações na relação glutatona reduzida/oxidada (28). A linha Mit-ATeam possibilita a quantificação da concentração de ATP na matriz mitocondrial (29), enquanto que linhas Mito-GFP permitem a visualização da morfologia e dinâmica da rede mitocondrial (fusão/fissão) (30). Adicionalmente, a linha MTS-Kaede é útil para estudar ao longo do tempo a dinâmica mitocondrial do transporte axonal de subpopulações mitocondriais específicas, uma abordagem importante na investigação de neuropatias periféricas (31). Por sua vez, linhas como as mito-GA possibilitam ainda a monitorização do cálcio mitocondrial, parâmetro crítico na sinalização celular e na fisiopatologia neuronal (32). Por último, a linha mito-Keima constitui uma ferramenta robusta para o estudo da mitofagia, uma vez que altera o seu espectro de excitação consoante o pH, e permite distinguir mitocôndrias funcionais de mitocôndrias em processo de degradação lisossomal (33).

_Do modelo experimental à medicina de precisão

A versatilidade do modelo de peixe-zebra impulsionou avanços significativos na recapitulação de fenótipos clínicos complexos associados às DM. A transparência embrionária, aliada a uma elevada conservação genética, facilita o estudo de patologias como a Atrofia Ótica Dominante, especificamente através da modelação da disfunção mitocondrial no gene *opa1* (34), e de neuropatias periféricas, como a doença de Charcot-Marie-Tooth (35). Adicionalmente, o modelo tem sido crucial na investigação de cardiomiopatias e defeitos na eritropoiese, correlacionando falhas na síntese do heme com

perturbações na fosforilação oxidativa (8). Esta capacidade de mimetizar mecanismos patológicos complexos posiciona o peixe-zebra como um aliado indispensável numa era dominada pela NGS.

_Conclusão

As mitocôndrias são pilares vitais da homeostase celular, cuja disfunção resulta em patologias graves e por vezes fatais, não existindo ainda terapias eficazes para a maioria dos casos.

A utilização do peixe-zebra como modelo biológico, aliada ao desenvolvimento de tecnologias de edição genética, facilita o acesso à medicina de precisão.

Esta sinergia entre o modelo animal e a edição genética avançada é fundamental para transformar diagnósticos incertos em terapias personalizadas, abrindo um caminho promissor para o tratamento das DM.

Referências bibliográficas:

- (1) Monzel AS, Enriquez JA, Picard M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nat Metab.* 2023 Apr;5(4):546-62. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00783-1>
- (2) Schon KR, Ratnaike T, van den Aemeele J, et al. Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. *Trends Genet.* 2020 Sep;36(9):702-17. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.06.009>
- (3) Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol.* 2015 May;77(5):753-59. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- (4) Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Oct 20;2:16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- (5) Filograna R, Koolmeister C, Upadhyay M, et al. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. *Sci Adv.* 2019 Apr 3;5(4):eaav9824. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9824>
- (6) Kotrys AV, Szczesny RJ. Mitochondrial Gene Expression and Beyond—Novel Aspects of Cellular Physiology. *Cells.* 2019 Dec 19;9(1):17. <https://doi.org/10.3390/cells9010017>
- (7) Mahmud S, Biswas S, Afrose S, et al. Use of Next-Generation Sequencing for Identifying Mitochondrial Disorders. *Curr Issues Mol Biol.* 2022 Feb 27;44(3):1127-48. <https://doi.org/10.3390/cimb44030074>
- (8) Steele SL, Prykhozhiy SV, Berman JN. Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases. *Transl Res.* 2014 Feb;163(2):79-98. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.08.008>
- (9) Teame T, Zhang Z, Ran C, et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim Front.* 2019 Jun 25;9(3):68-77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- (10) Glasauer SM, Neuhauss SC. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics.* 2014 Dec;289(6):1045-60. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>

- (11) Li Y, Jia Z, Zhang S, et al. Progress in Gene-Editing Technology of Zebrafish. *Bio-molecules*. 2021 Sep 1;11(9):1300. <https://doi.org/10.3390/biom11091300>
- (12) Dorner L, Stratmann B, Bader L, et al. Efficient genome editing using modified Cas9 proteins in zebrafish. *Biol Open*. 2024 Apr 15;13(4):bio060401. <https://doi.org/10.1242/bio.060401>
- (13) Cornet C, Di Donato V, Terriente J. Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol*. 2018 Jul 3;9:703. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00703>
- (14) Kroll F, Powell GT, Ghosh M, et al. A simple and effective F0 knockout method for rapid screening of behaviour and other complex phenotypes. *Elife*. 2021 Jan 8;10:e59683. <https://doi.org/10.7554/eLife.59683>
- (15) Kelly A, Hurlstone AF. The use of RNAi technologies for gene knockdown in zebrafish. *Brief Funct Genomics*. 2011 Jul;10(4):189-96. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr014>
- (16) Aspatwar A. Making sense of carbonic anhydrase function in zebrafish using antisense morpholinos. *Mol Genet Genomics*. 2025 Oct 17;300(1):99. <https://doi.org/10.1007/s00438-025-02303-0>
- (17) Stainier Dyr, Raz E, Lawson ND, et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet*. 2017 Oct 19;13(10):e1007000. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000>
- (18) Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Trends Genet*. 2018 Feb;34(2):101-10. Epub 2017 Nov 24. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.001>
- (19) Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol Med*. 2014 Apr;6(4):458-66. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303672>
- (20) Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*. 2020 Jul;583(7817):631-637. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2477-4>
- (21) Mok BY, Kotrys AV, Raguram A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA. *Nat Biotechnol*. 2022 Sep;40(9):1378-87. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01256-8>
- (22) Cruz-Zaragoza LD, Dahal D, Koschel M, et al. Silencing mitochondrial gene expression in living cells. *Science*. 2025 Jul 31;389(6759):eadr3498. <https://doi.org/10.1126/science.adr3498>
- (23) Stainier Dyr, Raz E, Lawson ND, et al. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet*. 2017 Oct 19;13(10):e1007000. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000>
- (24) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. The genetic landscape of mitochondrial diseases in the next-generation sequencing era: a Portuguese cohort study. *Front Cell Dev Biol*. 2024 Feb 23;12:1331351. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1331351>
- (25) Laranjeira M, Oliveira JMA, Santorelli FM, et al. Morpholino Knockdown in Zebrafish: A Tool to Investigate the Functional Impact of Variants of Unknown Significance in Mitochondrial Diseases. *Neuromolecular Med*. 2025 Oct 11;27(1):69. <https://doi.org/10.1007/s12017-025-08890-w>
- (26) Raftery TD, Jayasundara N, Di Giulio RT. A bioenergetics assay for studying the effects of environmental stressors on mitochondrial function in vivo in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017 Feb;192:23-32. Epub 2016 Dec 7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.001>
- (27) Konadu B, Hosler JP, Gibert Y, et al. Analysis of oxygen consumption rates in zebrafish reveals differences based on sex, age and physical activity recovery. *Front Physiol*. 2023 Sep 13;14:1272366. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1272366>
- (28) Panieri E, Millia C, Santoro MM. Real-time quantification of subcellular H2O2 and glutathione redox potential in living cardiovascular tissues. *Free Radic Biol Med*. 2017 Aug;109:189-200. Epub 2017 Feb 10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.022>
- (29) Kioka H, Kato H, Fujita T, et al. In vivo real-time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance. *FASEB J*. 2020 Feb;34(2):2041-54. <https://doi.org/10.1096/fj.201901686R>
- (30) Kim MJ, Kang KH, Kim CH, et al. Real-time imaging of mitochondria in transgenic zebrafish expressing mitochondrially targeted GFP. *Biotechniques*. 2008 Sep;45(3):331-34. <https://doi.org/10.2144/000112909>
- (31) Bergamin G, Cieri D, Vazza G, et al. Zebrafish Tg(hb9:MTS-Kaede): a new in vivo tool for studying the axonal movement of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1860(6):1247-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.007>
- (32) Wrighton PJ, Shwartz A, Heo JM, et al. Quantitative intravital imaging in zebrafish reveals in vivo dynamics of physiological-stress-induced mitophagy. *J Cell Sci*. 2021 Feb 22;134(4):jcs256255. <https://doi.org/10.1242/jcs.256255>
- (33) Vicente M, Salgado-Almario J, Soriano J, et al. Visualization of Mitochondrial Ca2+ Signals in Skeletal Muscle of Zebrafish Embryos with Bioluminescent Indicators. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 30;20(21):5409. <https://doi.org/10.3390/ijms20215409>
- (34) Rahn JJ, Stackley KD, Chan SS. Opa1 is required for proper mitochondrial metabolism in early development. *PLoS One*. 2013;8(3):e59218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059218>
- (35) Zhou W, Hsu AY, Wang Y, et al. Mitofusin 2 regulates neutrophil adhesive migration and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2020 Sep 4;133(17):jcs248880. <https://doi.org/10.1242/jcs.248880>