**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

JOÃO PAULO LOPES DA SILVA

**Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e
duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre
grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários**

Ribeirão Preto

2015

JOÃO PAULO LOPES DA SILVA

Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, João Paulo Lopes da

Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários. Ribeirão Preto, 2015.

81f.: il.,; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi.

1. Envelhecimento. 2. Instabilidade genômica.
3. Reparo de DNA. 4. RecQ Helicase. 5. Comprimento telomérico

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de mestrado – Fevereiro/2013 a março/2015)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP)
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA – HCFMRP – USP)
- NAPENV – Núcleo de Apoio a Pesquisas sobre o Envelhecimento e o idoso, Pró-Reitoria de Pesquisa da USP (Proc. 2012.1.17641.1.6)

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO LOPES DA SILVA

Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Genética

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico especialmente esse trabalho aos meus pais Elias e Dulcilene, aos meus irmãos Diógenes, Larissa e João Victor, por todo incentivo, amor e carinho, para que essa jornada fosse concluída.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela confiança em meu trabalho e por ter me disponibilizado de todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por toda a paciência, amizade e orientação.

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** por todo o incentivo e apoio, pela amizade e convivência durante este período de trabalho. .

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP pela atenção e apoio prestados.

Ao **Profa. Dra. Silvana Giuliatiti** coordenadora da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, ex-coordenadora da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo T. Calado** e todos os membros do Laboratório de Hematologia Experimental do HC-FMRP/USP, pelo auxílio nos experimentos e por me receber muito bem.

À **Profa. Dra. Maura Helena Manfrin**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seu laboratório e também as Alunas Natácia e Dora.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior** e aos membros de seu laboratório pela colaboração no meu trabalho. Em especial, **Amanda Riccar e Ernna Oliveira**, pela ótima convivência e troca de ensinamentos

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Luiz Augusto da Costa Júnior (Junão)** e **Sueli Aparecida Neves (prima da Branca de neve)**, por toda a assistência prestada, ensinamentos, conselhos e principalmente pela amizade. Muito obrigado por todas as risadas nesses anos de convívio!

Silvia Consiglieri, Gustavo Medeiros, Ana Cláudia de Souza e, em especial **Susie A. P. Nalon** por toda a atenção, apoio, ajuda, dedicação e simpatia.

Às instituições **FAPESP, CNPq e Capes** pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho seria possível.

Aos amigos de Laboratório de Citogenética e Mutagenese Ambiental: **Danilo** (Xitão) e **Paulo** (COP), companheiros de laboratório e do futebol, não cansam de perder pra mim no futebol; Giovana, por sempre me ajudar quando precisei; Ana Paula e Ana Clara, pela ajuda e descontração; Ao **Leo, Andrés, William, Veronica e Sara**, muito obrigado pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos ex-alunos deste laboratório, mas que de alguma forma ajudaram neste trabalho: Fernada C., Fernanda P., Tiago Jorge e Paula Takahashi.

Um agradecimento muito especial a todos as pessoas que generosamente deram sangue (literalmente) para realização deste trabalho.

Aos médicos que me auxiliam nas coletas de sangue: **Rômulo Lôbo, Silvio Bernardes e Paulo Duarte**.

Aos meus pais, **Elias e Dulcilene** pelo carinho, disposição em ajudar e por proporcionar tantas oportunidades, fazendo com que eu chegasse até esse ponto. Aos meus irmãos: **Diógenes, Larissa e João Victor**, pelo apoio, incentivo e carinho.

RESUMO

SILVA, J. P. L. **Comparação dos perfis transcricionais de genes de reparo e duplicação do DNA e medidas de comprimento telomérico entre grupos de indivíduos jovens, idosos e centenários.** 2015, 81f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A instabilidade genômica tem sido implicada como um dos principais fatores relacionados ao processo de envelhecimento. Esta é consequência do acúmulo de danos no DNA em células somáticas continuamente expostas a fatores endógenos e exógenos. Um grupo de proteínas que desempenha diversos papéis na manutenção e estabilidade do genoma é formado pelas RecQ helicases, atuando em vários processos do metabolismo celular, tais como replicação do DNA, recombinação, reparo do DNA e manutenção dos telômeros. Algumas evidências relacionam a expressão aberrante destas proteínas ao envelhecimento precoce. Com o objetivo de determinar os perfis de expressão transcricional de genes da família RecQ helicase e alguns genes envolvidos na via BER (Base excision repair), como *PARP1*, *POL β* e *APEX1* em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), comparamos grupos de indivíduos jovens (n = 20), idosos (n = 17) e centenários (n = 27). Além disso, foi também avaliado o comprimento telomérico em amostras de DNA desses indivíduos, buscando uma comparação entre os mesmos. Foi observada uma diminuição no nível de expressão transcricional do gene *BLM* nos grupos idoso e centenário quando comparados ao grupo jovem ($p < 0,05$). Também foi observado uma diminuição na expressão do gene *RECQL5* no grupo idoso comparado ao grupo jovem. Para os genes da via BER, foi observada uma repressão na expressão transcricional de *PARP1* no grupo idoso em relação ao grupo jovem ($p < 0,05$). Em relação ao comprimento telomérico, nossos resultados demonstraram associação entre a diminuição do comprimento telomérico e a idade. Obtivemos diferença significativa na comparação do comprimento telomérico de idosos e centenários comparados ao grupo jovem. Porém, não foi observada diferença entre os grupos idosos e centenários. Assim, nossos resultados mostram uma associação do processo de envelhecimento com a modulação de alguns genes da família RecQ helicase e participantes da via BER, e com o encurtamento telomérico. Os resultados gerados nesse trabalho são inéditos, sendo que relevantes para melhor compreensão do processo de envelhecimento.

Palavras-Chave: Envelhecimento, Instabilidade genômica, reparo de DNA, RecQ helicases e comprimento telomérico.

ABSTRACT

SILVA, J. P. L. Transcriptional profiles of DNA replication and repair genes and telomere length measurements in young, elderly and centenarians people. 2015, 81f, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Genomic instability plays a major role in the aging process due to the accumulation of DNA damage in somatic cells continuously exposed to endogenous and exogenous factors. A group of proteins essential in maintaining genome stability is composed by RecQ helicase, acting in several cell metabolism processes such as DNA replication, recombination, DNA repair and telomere maintenance. Some evidence related the aberrant expression of these proteins to premature aging. In order to determine the transcriptional expression profile of RecQ helicase gene family and some genes involved in the BER (Base excision repair) pathway, such as PARP1, POL β and APEX1 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), we compared groups of young (n = 20), elderly (n = 17) and centenarians (n = 27). Furthermore, it was also evaluated telomere length in DNA samples from these individuals. It was observed a decrease in the transcriptional expression of BLM gene in elderly and centenarians compared to the young group (p <0.05). It was also observed a decrease in expression of RECQL5 gene in the elderly compared to the younger group. For the BER genes, it was observed a transcriptional repression of PARP1 in the elderly group compared to the young group (p <0.05). Regarding the telomere length, our results demonstrated an association between reduction of telomere length and age. We obtained significant difference in comparing the telomere length of the elderly and centenarians compared to the younger group. However, no difference was observed between the elderly and centenarians groups. Thus, our results show an association of aging process with the modulation of certain genes from RecQ helicase family and participants of the BER pathway and the telomere shortening. The results generated in this study are promising, and relevant to better understanding the aging process.

Keywords: Ageing, Genomic instability, DNA repair, RecQ helicases and telomere length.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do telômero.	25
Figura 2. Densitometria da amostra de RNA do voluntário centenário C01 isolada de PBMCs. RNA <i>integrity number</i> (RIN) = 8,9.	34
Figura 3. Densitometria da eletroforese microfluídica das amostras de RNA total...43	
Figura 4. Expressão transcricional dos genes pertencentes a família RECQ helicasse em jovens, idoso e centenários avaliados por RT-qPCR.	45
Figura 5. Valores de <i>Fold-change</i> obtidos para genes pertencentes a família RecQ helicase.	46
Figura 6. Perfis de expressão gênica transcricional analisados por RT-qPCR para os genes PARP1 (A), POL B (B) e APEX1 (C) em amostras obtidas de indivíduos jovens, idosos e centenários.	47
Figura 7. <i>Fold-change</i> de genes de reparo do DNA (PARP1, POL β e APEX1).	48
Figura 8. Curvas ROC para a expressão gênica transcricional das RecQ helicases.	50
Figura 9. Eletroforese de DNA em gel de agarose.	51
Figura 10. Valores do comprimento telomérico obtidos para indivíduos jovens, idosos e centenários em função da idade, avaliados por qPCR quantitativa.	52
Figura 11. Comparação entre o comprimento telomérico entre os grupos jovem, idoso e centenário.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sondas hidrolisadas utilizadas nas reações de Real Time qPCR.....	39
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do Telômero e <i>Single Gene (36B4)</i> pelo método qPCR.....	40

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Envelhecimento.....	16
1.2	Instabilidade genômica, estresse oxidativo e reparo do DNA	18
1.3	RecQ helicases.....	20
1.4	Telômeros	23
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Geral	29
2.2	Específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Grupos de estudo	31
3.2	Coleta de sangue e separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	32
3.3	Extração de RNA, Quantificação e Avaliação de sua integridade	33
3.4	Extração de DNA	35
3.5	Transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção do cDNA.....	36
3.6	Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	37
3.7	Análise de comprimento telomérico	39
3.8	Análise estatística dos dados	40
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Avaliação da integridade das amostras de RNA	43
4.2	Expressão gênica transcricional	44
4.2.1	RecQ helicases	44
4.2.2	Genes de reparo do DNA	47
4.2.3	Curvas ROC.....	49
4.3	Medidas de comprimento telomérico	50

5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXOS	76
	ANEXO A - Aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP	77
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos indivíduos jovens e idosos	78
	ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos indivíduos centenários	80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento

O envelhecimento pode ser definido como uma deterioração progressiva das funções fisiológicas, acompanhada por um aumento da vulnerabilidade à morte (López-Otín et al. 2013). No âmbito celular, o envelhecimento é caracterizado por uma diminuição da taxa de divisão celular, alterações na expressão de genes e mudanças nas respostas a estímulos intra e extracelulares (Soerense et al. 2013). Uma importante mudança durante o envelhecimento é a perda insubstituível de células da musculatura esquelética, coração e cérebro. A musculatura estriada diminui pela metade por volta dos 80 anos de idade. O decréscimo nas células do coração resulta em alterações nas funções cardíacas, e essas alterações celulares e de tecidos conduzem ao declínio da função pulmonar. No cérebro, os neurónios encolhem e diminuem sua quantidade, acarretando alterações nas sinapses e redes neuronais (Hung et al. 2010).

Nos últimos anos, a taxa de mortalidade na população de indivíduos idosos tem diminuído drasticamente, elevando a porcentagem de idosos e aumentando a média da expectativa de vida da população mundial (Kolovou, 2014). Algumas doenças estão diretamente relacionadas ao envelhecimento humano, tais como doenças cardiovasculares, aterosclerose, demência, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer, osteoporose e câncer (Soerense et al. 2013). Nesse contexto, torna-se crescente o interesse dos pesquisadores no estudo do envelhecimento.

Um aumento surpreendente na expectativa de vida tem sido observado em países desenvolvidos, com um ganho de aproximadamente 30 anos na expectativa média de vida, desde o início do último século (Christensen et al. 2009). Como exemplo, cerca de 12% da população dos Estados Unidos tem mais de 65 anos de idade, e esta população irá aumentar para aproximadamente 20% até 2030 (He et al. 2005). Em 1950, apenas 8% da população mundial apresentava 60 anos ou mais. Atualmente, essa proporção é 12% e espera-se que atinja 21% da população mundial em 2050. O número de pessoas idosas (com 60 anos ou mais) aumentará

cerca de 2,4 vezes, passando de 841 milhões em 2013 para mais de 2 bilhões em 2050. Em contraste, o número de crianças (com menos de 15 anos de idade) dificilmente aumentará sua proporção, contabilizando uma redução de 26 para 21% da população mundial total (United Nations, 2013).

O Japão é o país com a maior expectativa de vida no mundo, sendo 86 anos para as mulheres e 79 anos para os homens em 2009. Além disso, é o país com maior proporção de pessoas com mais de 65 anos de idade em todo o mundo, havendo cerca de 22% da população nessa faixa etária, sendo que essa proporção tende a aumentar nos próximos anos (Long, 2012). No Brasil, em 2013, a população total era de aproximadamente 200 milhões de indivíduos, com 11,2 % dessa população apresentando idade acima de 60 anos e 1,6 % com idade superior a 80 anos. Para o ano de 2050, o Brasil deverá alcançar 29 % de idosos (com 60 anos ou mais) e 6,8 % com idade superior a 80 anos (United Nations, 2013).

O grupo de pessoas com mais de 100 anos de idade, chamados de centenários, também sofreu um aumento significativo nos últimos anos. A população de centenários atinge esse limite extremo de vida com uma saúde relativamente boa, escapando de doenças relacionadas à idade avançada, tais como câncer e doenças cardiovasculares (Caruso et al. 2012). Em idade excepcional, foi observado que o aparecimento de doenças relacionadas à idade ocorre mais tarde em 30% dos centenários, 56% dos semi-supercentenários (100-109 anos) e quase 70% dos supercentenários (110-119) escapam da maioria das doenças relacionadas à idade, incluindo a demência (Newman e Murabito, 2012). Outro importante dado em relação aos centenários foi relatado pelo *New England Centenarian Study*, mostrando que irmãos de centenários têm uma probabilidade significativamente maior de atingir idades superiores a 90 anos, comparados a pessoas nascidas no mesmo ano (Perls et al. 2002).

Há relatos na literatura mostrando que o processo de envelhecimento se relaciona a vias envolvidas no estresse oxidativo, metabolismo lipídico e de glicose, inflamação, dano e reparo de DNA, hormônio de crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina (GH / IGF), além de respostas à exposição ambiental (Mora et al. 2011; Jirtle e Skinner, 2007; Kolovou, 2013). Estima-se que 25 % da variação do tempo de vida humano estejam relacionados a fatores genéticos, sendo esse efeito menor em idade inferior a 60 anos e maior após 85 anos (Hjelmborg et al. 2006; Debrabant et al. 2014). Alguns genes são apontados como candidatos em atuar na

longevidade humana, codificando proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo resposta a danos no DNA, que são essenciais em algumas funções celulares, devido à exposição constante a vários tipos de agentes exógenos e endógenos (Christensen, Johnson e Vaupel, 2006; Debrabant et al. 2014).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com intuito de compreender as bases moleculares do envelhecimento, sendo que inúmeros processos celulares são apontados como intrinsicamente relacionados, tais como alterações epigenéticas, acúmulo de danos na molécula de DNA, declínio das vias de reparo do DNA, disfunção mitocondrial, encurtamento dos telômeros, entre outros (Campisi e Vijg, 2009; Lopez-Otin et al. 2013). Há evidência de que muitos desses processos levam à instabilidade genômica (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2 Instabilidade genômica, estresse oxidativo e reparo do DNA

A integridade e a estabilidade da molécula de DNA são cruciais para a homeostase dos organismos; no entanto, o DNA é constantemente submetido a fatores exógenos (físicos, químicos e biológicos) bem como a fatores endógenos capazes de alterar a integridade química da molécula de DNA, gerando instabilidade genômica. Os fatores endógenos provocam erros na duplicação do DNA e lesões de diferentes tipos, incluindo aquelas resultantes de reações hidrolíticas espontâneas e da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Hoeijmakers, 2009).

As ROS são consideradas uma classe importante de radicais livres, sendo que estes podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais atômicos ou moleculares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Esses elétrons não pareados geralmente garantem um considerável grau de reatividade para o radical livre. ROS derivados de oxigênio representam uma classe importante das espécies geradas em sistemas vivos (Miller, Buettner e Aust, 1990). As ROS incluem os radicais livres superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxil ($HO^{\cdot}$), bem como moléculas desprovidas de radicais livres, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas moléculas são geradas principalmente a partir do oxigênio, que é consumido em várias reações metabólicas, ocorridas

principalmente nas mitocôndrias, perioxossomos e no retículo endoplasmático. Estima-se que cerca de 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias sofram redução, gerando os radicais superóxido. Desta forma, as mitocôndrias são consideradas as principais fontes de ROS (Finkel; Handy e Loscalzo, 2012).

As ROS, em geral, são essenciais para a sinalização celular e outras funções fisiológicas vitais, no entanto, quantidades excessivas podem causar alterações no equilíbrio de oxidação-redução (redox) e perturbar funções biológicas normais (Aprioku, 2013). O equilíbrio entre efeitos benéficos e nocivos dos radicais livres é um aspecto muito importante nos organismos, sendo esse equilíbrio alcançado por mecanismos de "regulação redox". Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por ROS envolvem defesas antioxidantes por enzimas específicas e mecanismos de reparo do DNA (Sies, 1997; Valko et al., 2007).

O desequilíbrio de ROS pode danificar os componentes celulares como lipídeos, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal. Devido a isso, o estresse oxidativo tem sido associado a diversas doenças, tais como diabetes e doenças neurodegenerativas (Valko, 2007), bem como ao processo de envelhecimento (Sastre, 1996; Lobo et al. 2010). Uma das consequências mais deletérias do estresse oxidativo inclui a formação de lesões no DNA. Mais de 100 tipos diferentes de modificações oxidativas já foram identificados no genoma de mamíferos. No entanto, a base mais vulnerável devido ao seu baixo potencial redox é a guanina (David et al. 2007), sendo que o principal produto da oxidação dessa base é a 8-oxo-guanina (8-oxoG) (Van loon et al. 2010). Uma das lesões mais estáveis e mutagênica é a 8-oxo-Guanina (8-oxoG), que devido ao pareamento tanto com a citosina quanto com a adenina, pode resultar em transversões de C:G para A:T (David et al. 2007).

Em eucariotos, as diversas lesões induzidas no DNA podem ser reparadas por várias vias de reparo do DNA: (1) reversão direta de modificações químicas dos ácidos nucléicos; (2) reparo de bases mal pareadas (MMR, do inglês *mismatch repair*); (3) reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*); (4) reparo por excisão de bases (BER, *base excision repair*), que repara principalmente bases oxidadas, alquilações e quebras de cadeia simples; (5) recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*), responsável pelo reparo de quebras duplas no DNA; (6) reparo por união de extremidades não

homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), que como o HR, também repara quebras duplas no DNA; (Hakem, 2008; Hoeijmakers, 2009).

Uma diminuição significativa da atividade da via BER tem sido relatado no processo de envelhecimento, principalmente devido à redução da atividade de glicosilases e da polimerase β (Li e Vijg, 2013). O passo inicial do reparo por excisão de base consiste na remoção da base danificada pelas DNA glicosilases, seguido da incisão por uma AP endonuclease, remoção da extremidade AP, síntese de DNA para o preenchimento do gap formado e por último, a ligação das extremidades por uma DNA ligase (Grosh et al. 2010). A via BER pode ocorrer pela inserção de um único nucleotídeo, conhecida como via curta de BER, ou pela via que insere 2 a 13 nucleotídeos, conhecida como via longa de BER. Na via curta, após a ação da DNA glicosilase, a endonuclease APEX1 realiza a clivagem da fita danificada e a DNA polimerase β catalisa a remoção do sítio AP e insere um novo nucleotídeo, seguido da ligação das extremidades pelo complexo DNA ligase III/XRCC1. Na via longa, ocorre a participação de polimerases β ou δ/ϵ , associadas a PCNA, FEN1, PARP1 entre outras, realizando a excisão de 2 a 13 nucleotídeos, seguido da síntese de novos nucleotídeos, sendo o reparo finalizado com a ligação pela DNA ligase I e pelo complexo DNA ligase III/XRCC1 (Klungland e Lindahl, 1997; Sancar et al., 2004).

1.3 RecQ helicases

A separação das fitas complementares do DNA e/ou duplex de RNA é requisito fundamental para processos como a duplicação, recombinação, reparo e transcrição, sendo essa separação mediada pelas proteínas da família das helicases (Umate, 2011). Inicialmente, o reconhecimento de danos no DNA é efetuado pelas helicases, identificando prontamente distorções helicoidais na molécula de DNA, desempenhando importante papel no reparo das lesões, sendo as primeiras proteínas a encontrarem as lesões no DNA (Balasingham et al. 2012). Identificadas pela primeira vez na década de 1970, as helicases são proteínas motoras que convertem energia química em trabalho mecânico, por meio da hidrólise de

adenosina trifosfato (ATP) ou de nucleosídeos trifosfatos (Singleton e Wigley, 2002; Von Hippel, 2004).

Um dos grupos mais estudados de helicases é a família RecQ, assim nomeada devido ao produto gênico da *Escherichia coli recQ*⁺ (Bachrati e Hickson, 2008). Foram descritos cinco genes da família RecQ helicase humana, os quais codificam as proteínas RECQL1, WRN (Werner), BLM (Bloom), RECQL4 e RECQL5. WRN e BLM são relativamente bem estudadas, enquanto que RECQL1, RECQL4 e RECQL5 são ainda pouco conhecidas quanto ao papel de cada uma delas (Bohr, 2008).

Alterações nas RecQ helicases têm sido associadas a anomalias cromossômicas e de desenvolvimento, suscetibilidade ao câncer, além de envelhecimento prematuro (Brosh e Bohr, 2007). Mutações nos genes *WRN* e *BLM* são responsáveis por doenças genéticas distintas, conhecidas como síndrome de Werner (WS) e síndrome de Bloom (BS), respectivamente. As mutações em RECQL4 causam as síndromes Rothmund-Thomson (RTS), RAPADILINO (RAPA) e Baller-Gerold (BGS) (Siitonen, 2009). Embora tais distúrbios sejam associados com instabilidade genômica e predisposição ao câncer, eles mostram características clínicas distintas, sugerindo que essas três proteínas sejam envolvidas em diferentes vias metabólicas (Popuri et al. 2008)

Indivíduos com a síndrome de Bloom são caracterizados por baixa estatura e por exibirem eritemas na pele em áreas expostas ao sol, além disso, apresentam predisposição a vários tipos de câncer, como por exemplo, tumores epiteliais, leucemias, linfomas e tumores pediátricos raros (German, 1997). A síndrome de Werner é uma doença genética caracterizada por traços de envelhecimento prematuro e aparecimento precoce de doenças relacionadas à idade, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (tipo II), osteoporose, sarcoma e tumores mesenquimais (Martin, 1985). Diferentemente de WRN, BLM e RECQL4, duas outras RecQ helicases (RECQL1 e RECQL5) ainda não foram relacionadas a doenças específicas, mas parece provável que estas últimas desempenhem um papel na predisposição ao câncer ou em doenças hereditárias caracterizadas por instabilidade cromossômica (Sharma, 2006).

Danos químicos na molécula de DNA podem alterar os processos de duplicação e transcrição, sendo implicados em mutagenese, letalidade celular, carcinogênese, envelhecimento e distúrbios neurológicos. Existem processos de

reparo de DNA dependentes de helicases e mecanismos de tolerância de danos no DNA para preservar o conteúdo da informação genética e a integridade do genoma (Brosh, 2013). Nesse sentido, as RecQ helicases desempenham diversos papéis na manutenção e estabilidade do genoma, havendo evidência de que distúrbios na regulação da expressão destas possam levar ao envelhecimento prematuro e tumorigênese (Berns, 2010), embora muitos aspectos e mecanismos ainda requeiram esclarecimento. Conforme mencionado anteriormente, danos oxidativos podem ser reparados pela via BER, embora não seja a única via. Foi observado que WRN tem participação na via BER e interage fisicamente com várias proteínas envolvidas nesse mecanismo (Rossi, 2010). Como exemplo de interações, foi relatado que APE1 é inibida por WRN (Ahn, 2004) e estimulada por RECQL4 *in vitro* (Schurman, 2009). Adicionalmente, APE1 é regulada positivamente em células RTS (Schurman, 2009) e tem sua expressão aumentada em sarcomas e em tumores de pacientes RTS e WS (Wang, 2004). Outro importante componente da via BER é a enzima PARP1, a qual desempenha um papel importante na resposta celular. Foi observado que WRN, RECQL1 e RECQL4 interagem entre si, sendo moduladas por PARP1 (Sousa, 2012; Thomas, 2013; Croteau, 2014). PARP1 ribosila muitas proteínas celulares, mas tem sua ação reprimida em células WRN-deficientes, indicando que PARP1 pode ser ativada ou estimulada por WRN (Kobbe, 2003). Além disso, as RecQ helicases parecem desempenhar importante papel no reparo de quebras de fita dupla. A proteína RAD51, que atua na no reparo homólogo, interage com WRN (Otterlei et al., 2006) e BLM (Wu et al., 2001).

Alguns estudos indicam que as RecQ helicases desempenham funções distintas na duplicação e no reparo do DNA, manutenção dos telômeros e também nos *checkpoints* ativados em resposta a danos no DNA (Vindigini, 2010). Especificamente nos telômeros, as RecQ helicases desempenham importante papel na resolução de estruturas que possam impedir a duplicação do DNA telomérico, causando a parada ou bloqueio na progressão da forquilha de replicação (Singh, 2012). O DNA telomérico pode formar estruturas secundárias envolvendo guaninas, como exemplo, as G-quadruplex (G4), as quais são formadas no DNA telomérico. WRN e BLM atuam na resolução das estruturas G4. O DNA telomérico também é propenso a numerosos tipos de danos no DNA, incluindo danos oxidativos, quebras de cadeia dupla e simples (Ghoshi et al. 2010). Dessa forma, as RecQ helicases podem atuar na dissociação de diversas estruturas, bem como interagir com

proteínas envolvidas no reparo de DNA, mostrando a necessidade de novos estudos para avaliar o exato papel das RecQ helicases nos processos citados acima.

1.4 Telômeros

Herman Muller e Barbara McClintock foram provavelmente os primeiros pesquisadores a reconhecerem que as extremidades dos cromossomos eucariontes deveriam apresentar funções especiais e cruciais. Esses cientistas chegaram à mesma conclusão aproximadamente ao mesmo tempo, tendo sugerido que as extremidades naturais dos cromossomos são diferentes daquelas geradas por quebra cromossômica (Blackburn et al., 2006). As extremidades naturais são de alguma forma protegidas dos rearranjos frequentes que ocorrem em extremidades originadas de quebras cromossômicas. Muller cunhou o termo “telômero” para essas estruturas (das palavras gregas *telos* = fim e *meros* = parte) (Muller, 1938).

No entanto, mesmo que fosse evidente o papel dos telômeros no sentido de proteger a integridade do DNA nas extremidades dos cromossomos, não havia ferramentas para compreender a natureza molecular dessas extremidades. Os achados de Muller e McClintock ocorreram antes do conhecimento de que o material genético era representado pela molécula de DNA. Somente em 1953 foi publicado o modelo de Watson e Crick sobre a estrutura da molécula de DNA, que também possuía como previsão o mecanismo semi-conservativo de duplicação do DNA, aceito até os dias de hoje (Watson e Crick, 1953). Assim, no final da duplicação, as duas fitas recém-sintetizadas serão cópias idênticas das fitas utilizadas como moldes, contendo a mesma sequência de nucleotídeos e comprimento (Zakian, 2012).

Durante a duplicação do DNA eucariótico, as fitas em posição anti-paralelo não são duplicadas de forma semelhante, de tal forma que uma cadeia é sintetizada de forma contínua e a outra, de forma descontínua, em fragmentos de Okazaki. O início da síntese de cada fragmento requer um iniciador ou RNA primer, o qual oferece um grupamento 3'-OH livre para a adição do novo nucleotídeo pela enzima DNA polimerase. Conforme prossegue a síntese, o RNA primer é removido,

deixando um espaço vazio, o qual é preenchido e as extremidades entre os fragmentos são ligadas. Entretanto, na cadeia sintetizada em fragmentos de Okazaki, denominada cadeia atrasada ou “lagging”, a remoção do último RNA primer leva à formação de uma falha, que não é capaz de ser preenchida pela falta de um grupo 3'-OH nessa extremidade, gerando um encurtamento da fita recém-sintetizada. Consequentemente, a fita recém-formada é ligeiramente mais curta do que a cadeia molde. Assim, cada vez que uma célula se divide, algumas das sequências de nucleotídeos nas extremidades do cromossomo são perdidas (Monaghan e Haussmann, 2006; Calado, 2009), ocasionando o problema do final da duplicação, originalmente denominado “marginotomia”, relativo à perda gradual das extremidades dos cromossomos (Olovnikov, 1971, 1973).

Em humanos e outros vertebrados, a sequência telomérica do DNA é composta por repetições de hexâmeros com a sequência TTAGGG nas extremidades do cromossomo (Moyzis et al 1988; Allshire et al. 1988; Blackburn, 2012). Essas sequências repetidas são constituídas por repetições curtas ricas em guanina (G) na fita que contém o final 3', chamada de fita G. A fita complementar, contendo o final 5', é denominada fita C, pois é rica em citosina (C). O DNA telomérico forma uma estrutura extremamente especializada, na qual a fita G apresenta uma saliência na porção 3', que se dobra para trás sobre si mesma, invadindo as repetições teloméricas de fita dupla, criando assim uma aparência de alça, conhecida como “T-loop”. (Kong et al. 2013) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura do telômero.

Os telômeros humanos são compostos por longas sequências repetitivas, TTAGGG, e um complexo de proteínas específicas denominadas coletivamente de shelterinas (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 e RAP1), conferindo proteção ao DNA. (Calado & Young, 2009).

Na espécie humana, o comprimento médio dos telômeros varia de 10 a 15 quilobases (Cairney e Keith, 2008). Entretanto, o DNA telomérico inevitavelmente diminui a cada replicação celular, acumulando uma perda de 50 a 200 pares de bases (Kong et al. 2013).

A natureza repetitiva e a sequência de DNA telomérico está associada a proteínas específicas de proteção, chamadas coletivamente de “shelterin”. Em humanos, o complexo *shelterin* inclui seis proteínas: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1 (De Lange, 2009; Lee et al. 2011). Assim, toda a estrutura telomérica atua como um sistema de proteção, assegurando a integridade dos cromossomos, a estabilidade do genoma e a progressão do ciclo celular (Lee et al. 2011).

Quando os telômeros encurtam e atingem um comprimento crítico, as células entram em senescência ou apoptose. Em cultura, fibroblastos normais podem dividir em torno de 50 vezes antes de entrar em senescência (Hayflick e Moorhead, 1961). Cromossomos com telômeros encurtados perdem a estrutura protetora em suas extremidades, sendo então reconhecidos como quebras de fitas, desencadeando o

recrutamento de sensores de dano ao DNA e consequentemente ativando a proteína p53, conduzindo à senescência e à morte celular (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Samassekuo et al. 2010).

Diferente das células somáticas, células com alta capacidade proliferativa, como as linhagens germinativas e as células-tronco, não sofrem o desgaste dos telômeros por expressarem a telomerase, uma transcriptase reversa que catalisa a síntese de DNA telomérico, evitando assim a sua redução ou erosão telomérica (Calado e Young, 2009). O complexo telomerase catalisa a adição de repetições teloméricas por meio do complexo formado pela enzima transcriptase reversa (TERT) e o componente de RNA que serve como molde para o alongamento telomérico (TERC). O complexo catalítico da telomerase é composto por duas moléculas de cada um dos TERT e TERC, a proteína disquerina (codificada pelo gene DKC1), entre outras proteínas, como NHP2, NOP10 e GAR1 (Greider e Blackburn, 1985; Lingner et al., 1997; Calado e Young, 2009).

Algumas doenças humanas associadas ao encurtamento telomérico estão relacionadas com defeitos na atividade da telomerase ou com mutações em genes do sistema de reparo do DNA. Como exemplo, a disqueratose congênita é uma síndrome de envelhecimento prematuro, na qual as células apresentam mutações no complexo da telomerase, resultando na diminuição da atividade da telomerase e, desta forma, em telômeros mais curtos (Mitchell, 1999). Outras síndromes, que apresentam características de envelhecimento prematuro, incluem aquelas causadas por mutações em proteínas de reparo do DNA, tais como NBS1 (síndrome de quebra de Nijmegen), MRE11 (Ataxia Telangiectasia desordem-like), WRN (síndrome de Werner), BLM (síndrome de Bloom), ATM (Ataxia Telangiectasia) e FANC (anemia de Fanconi), as quais também estão relacionadas com uma taxa acelerada de desgaste telomérico e maior instabilidade cromossômica (revisado em Blasco, 2005).

Alguns trabalhos demonstraram a existência de uma correlação inversa entre o comprimento telomérico e a idade, embora essa correlação seja influenciada por etnia e gênero, com homens apresentando telômeros mais curtos do que mulheres (Müezziner et al. 2013; Gardner et al. 2014). Também é importante ressaltar que o encurtamento telomérico é acelerado pelo acúmulo de dano oxidativo, resultante de quebras de fitas simples do DNA telomérico (Von Zglinicki e Martin-Ruiz, 2005).

Devido às suas funções essenciais no metabolismo do DNA, na manutenção da estabilidade do genoma e, mais especificamente, nas respostas coordenadas ativadas frente à indução de danos no DNA, alterações na regulação da expressão das RecQ helicases podem constituir um fator crítico nos mecanismos ligados ao envelhecimento e na etiologia das doenças associadas à idade (Brosh e Bohr, 2007), sendo que esses aspectos ainda necessitam ser explorados para a compreensão da complexa cascata de sinalização molecular e as consequências dos distúrbios em genes alvos críticos participantes das vias de sinalização ligadas a respostas ao estresse genotóxico.

Com a finalidade de obter uma melhor compreensão do envelhecimento humano e da longevidade, o presente trabalho foi fundamentado na hipótese de que os indivíduos em diferentes estágios do processo de envelhecimento apresentam perfis distintos de expressão de genes da família RecQ helicase e de alguns genes representantes da via BER. Além disso, com base nos dados da literatura, foi pressuposta a existência de correlação entre o encurtamento telomérico e alterações na expressão dos genes da família RecQ helicase e participantes da via BER.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo determinar os perfis de expressão transcricional (mRNA) de genes da família RecQ helicase e genes envolvidos na via de reparo por excisão de bases em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), comparando grupos de indivíduos, os quais foram agrupados em três diferentes estágios do processo de envelhecimento (jovens, idosos e centenários). Além disso, foi também proposto avaliar o comprimento telomérico em amostras de DNA desses indivíduos, buscando uma comparação entre os mesmos.

2.2 Específicos

- Avaliar a expressão transcricional dos genes da família RecQ helicase (*RECQL1*, *BLM*, *WRN*, *RECQL4* e *RECQL5*) em PBMCs de indivíduos jovens, idosos e centenários, comparando os diferentes grupos entre si.
- Avaliar a expressão transcricional dos genes envolvidos em vias de reparo do DNA (*APE1*, *POL β* e *PARP1*) em PBMCs, comparando os diferentes grupos: jovens, idosos e centenários.
- Avaliar o comprimento telomérico em PBMCs de voluntários jovens, idosos e centenários.
- Investigar a influência da expressão dos genes da família RecQ helicase quanto ao comprimento telomérico avaliado nos três grupos: jovens, idosos e centenários.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos de estudo

No presente estudo foram selecionados 64 indivíduos da cidade de Ribeirão Preto - SP. Entre eles, 20 indivíduos jovens com idade entre 18 a 26 anos (média de $22,9 \pm 2,31$), sendo 7 homens e 13 mulheres; 17 indivíduos idosos com idade entre 64 a 84 (média de $72,6 \pm 5,54$), sendo 3 homens e 14 mulheres; 27 voluntários centenários com idade de 100 a 109 anos (média de $101 \pm 1,92$ anos), sendo 6 homens e 21 mulheres, os quais apresentaram documento comprobatório da idade dos mesmos.

Todos os indivíduos jovens foram selecionados no campus USP de Ribeirão Preto. As amostras de sangue foram coletadas no laboratório de citogenética e mutagênese do departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, local onde foi executado o presente trabalho. A seleção dos indivíduos idosos foi realizada no ambulatório de geriatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), com a colaboração do Prof. Dr. Julio Cesar Moriguti, departamento de Clínica Médica (Geriatria) e no Centro Saúde-Escola Cuiabá (SCE-Cuiabá), administrado pela universidade de São Paulo. Os doadores centenários foram identificados por meio de informações da Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto, sendo os mesmos selecionados para o projeto de pesquisa “Estudo dos Centenários de Ribeirão Preto – Brasil”, desenvolvido pelo doutorando Paulo Duarte (aprovado pelo CEP: Proc.: HCRP 903/2012), sob orientação da Prof^a Dr^a Nereida Kilza da Costa Lima do departamento de Clínica Médica-FMRPUSP (Geriatria). O presente estudo utilizou indivíduos que complementaram o projeto, aprovado pelo CEP local (Proc. nº 10374/2009).

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: histórico de exposição às radiações; infecções; uso crônico de medicamentos; portadores de diabetes; demência; neoplasia maligna; AVC prévio; doenças cardíacas ou qualquer outro tipo de doença crônica; etilistas e tabagistas ativos.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMRP/USP (processo nº 13966/2014 - Anexo A). Todos os participantes e/ou seus responsáveis foram esclarecidos acerca da natureza do estudo, dos testes aos quais seriam submetidos e o motivo da coleta de sangue, tendo lido, concordado em participar da pesquisa ou em caso de impossibilidade de manifestação, com a concordância do familiar responsável, assinando o termo de consentimento livre-esclarecido (TCLE) (ANEXO B e ANEXO C) de acordo com as normas exigidas pelo CEP do HC-FMRP/USP.

3.2 Coleta de sangue e separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As amostras de 20 mL de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos *vacutainer* com EDTA® (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da separação das PBMCs, realizado no mesmo dia da coleta. O isolamento das células mononucleares foi realizado por meio de centrifugação por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque (d = 1,077 g/mL) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com procedimento previamente descrito por Boyum, 1968 com modificações.

Durante a separação celular foi adicionado a cada amostra de sangue volume igual de solução salina 0,9% estéril (1:1). As amostras foram então depositadas gentilmente sobre uma solução Ficoll-Paque na proporção 2:1. Os tubos com as amostras foram centrifugados por 15 minutos a 400 x g a temperatura ambiente. Após a centrifugação, um anel de células mononucleares foi obtido, localizado na interface entre o Ficoll-Paque e o plasma sanguíneo. Essas células foram colhidas com auxílio de pipeta *Pasteur* e submetidas a lavagem com solução salina 0,9% estéril e posterior centrifugação a 100 x g por 7 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 200 µL de solução salina, tratada previamente com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, as células separadas das amostras foram submetidas a separação de fases orgânicas.

3.3 Extração de RNA, Quantificação e Avaliação de sua integridade

As amostras de RNA obtidas de PBMCs foram extraídas com a utilização do reagente TRIzol (Invitrogen), que consiste de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, permitindo realizar a precipitação sequencial de RNA, DNA e proteínas a partir de uma única amostra, de acordo com procedimento previamente descrito (Chomczynski, 1993). Para tal, foi utilizado 1 mL do reagente para cada 5 mL de amostra de sangue total, que foram então divulsionadas vigorosamente e então incubada por cinco minutos à temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de salina DEPC e 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol às amostras, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Para a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica), os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo que o RNA se conservou exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para um novo tubo.

A precipitação do RNA procedeu-se com a adição de 800 µL de isopropanol para cada 1 mL de TRIzol, seguido de homogeneização por inversão e incubação a -20 °C *overnight*. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, para retirada de impurezas do RNA foram realizadas três lavagens com 1 mL de etanol 75% DEPC gelado para cada 1 mL de TRIzol. Durante cada uma das lavagens, as amostras foram misturadas por 1 min seguido de centrifugação a 7500 x g por 5 min a 4°C. Após a etapa das lavagens e evaporação de todo o etanol, o RNA foi eluído em 20 µL de água previamente tratada com DEPC e imediatamente armazenado em freezer -80 °C.

Todas as amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas quanto a sua pureza utilizando o espectrofotômetro *NanoVue Plus®* (GE Life Sciences) nos comprimentos de onda 230nm, 260nm e 280nm. Sendo que os valores considerados ideais para a razão A260/A280 variam entre 1,8 e 2,1, demonstrando ausência de contaminação por proteínas. Também foi avaliado a contaminação por compostos orgânicos, tais como fenol e/ou guanidina, através da razão A260/A230, não

podendo os valores serem inferiores a 1,7 ou superiores a 2,2. Somente as amostras que apresentaram razões dentro das faixas aceitáveis foram utilizadas.

A integridade da molécula de RNA foi avaliada pelo *kit* RNA 6000 Nano (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA, EUA), no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent), seguindo as instruções do fabricante. O gel para separação das amostras de RNA e as próprias amostras (150 ng de RNA) foram aplicadas em nano chips contendo microcanais interconectados, os quais foram usados para a separação dos fragmentos por eletroforese. Este sistema calcula o número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*) com escala de 0 a 10. No presente trabalho foram somente utilizadas amostras com valor de integridade $\geq 7,0$ (Figura 2). Segundo recomendações da *Agilent*, as amostras que apresentarem RIN menores que 7,0 devem ser descartadas.

Figura 2. Densitometria da amostra de RNA do voluntário centenário C01 isolada de PBMCs. RNA integrity number (RIN) = 8,9.

3.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de extração *Gentra® Puregene® Blood Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), adaptado para sangue periférico congelado (-80 °C). Para tal, foi utilizado 300 µL de sangue periférico congelado de cada amostra, adicionando-se 20 mL de solução de lise de glóbulos vermelhos, incubando-se por 10 minutos a temperatura ambiente e subsequente centrifugação a 3.000 x g por 5 min. Após a centrifugação, retirou-se todo o sobrenadante, adicionando-se posteriormente 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês phosphate buffered saline) e centrifugado a 2000 x g por 3 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado. Imediatamente, foi adicionado 400 µL de solução de lise de glóbulos brancos, seguido de homogeneização por inversão e incubação a temperatura ambiente *overnight*. Após este período, acrescentou-se 200 µL solução de precipitação de proteínas a cada amostra, homogeneizando vigorosamente por 20 segundos e centrifugando-se a 3000 x g por 5 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de isopropanol absoluto gelado a cada amostra, com posterior agitação por inversão e centrifugação a 2000 x g por 5 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi realizada lavagem em cada amostra utilizando-se 500 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 2.000 x g por 3 minutos a 4 °C. O etanol foi descartado, sendo o pellet seco a temperatura ambiente, deixado para secar com o tubo aberto e invertido por 20 min. O DNA foi eluído em 25 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético) e estocado a 4 °C. Após o período de 24 horas, as amostras foram quantificadas no aparelho de espectrofotometria *NanoVue Plus®* (GE Healthcare Life Sciences). Ao final, o material foi estocado a -20°C até o momento de uso. A integridade do DNA genômico extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo.

3.5 Transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção do cDNA

Para remoção de possíveis moléculas de DNA nas amostras de RNA, utilizou-se o *kit Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen)*, com volume final de 10 µL para cada amostra seguindo as seguintes proporções: 1 µL de *DNase Reaction Buffer* 10x (Invitrogen), 1 µL de *DNase I Ampgrade* 1U/µL (Invitrogen), 1 µg de RNA total e água livre de nucleases para completar o volume. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente por 15 minutos, seguindo com adição de 1 µL de EDTA (25 mM) para inativação da DNase, as amostras foram então aquecidas por 10 minutos a 65 °C, finalizando a reação.

Após a etapa de purificação do RNA, foram realizadas as reações de RT-PCR para obtenção de cDNA. Para tal, foi utilizado o *kit superScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)*, adicionando-se 0,5 µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (0.5 µg/µl) aos RNAs provenientes da reação com DNase. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 70°C e transferidas para gelo ao fim da reação. Logo após, acrescentou-se 4 µL *5x First-strand Buffer*, 2 µL de *DTT* (0,1 M), 1 µL de *dNTP* (10 mM) e 1 µL de *superScript® III RT* (200 U/ µL) em cada amostra. As amostras foram então diluídas e incubadas a 50 °C por 50 minutos e seguido de inativação da reação incubando-se as amostras a 70 °C por 15 minutos. O produto da reação foi estocado a -20 °C.

Para a confirmação da reação de transcrição reversa, realizou-se uma PCR convencional utilizando o *kit Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen)*. As reações foram compostas por 2,5 µL de 10x *PCR reaction buffer*, 1,0 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 µL de *dNTP* (10 mM), 0,5 µL do iniciador *B2M forward* (5' CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC 3') e 0,5 µL do *reverse* (5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3'), 0,5 µL de *Taq DNA polymerase recombinant* (5 U/µL) e 1,0 µL do cDNA, por fim, o volume da reação foi completado para 25 µL com água livre de nucleases (Ambion, Grand Island, NY, EUA). O programa utilizado consistiu de um primeiro passo por 5 minutos a 94 °C, 34 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C e um passo final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% (80V por 1 hora) corado com *Gel Red®* 40x (Invitrogen). Foi possível observar no gel uma banda entre as faixas de 100 pb e 150 pb, correspondente ao

tamanho do produto para os iniciadores do gene endógeno *B2M* testado, confirmando assim o sucesso da transcrição reversa. As amostras foram estocadas a -20 °C.

3.6 Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A avaliação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando-se a metodologia *Prime Time*[®] qPCR Assay, que incluem *ZEN Double-Quencher Probes* e primers (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Para tal, foi realizada a quantificação relativa (RQ, do inglês *Relative Quantification*), a qual permite determinar mudanças na expressão de genes em uma amostra com relação a uma amostra designada como calibrador. Em nosso trabalho, a média da expressão do grupo composto por jovem foi utilizado como calibrador.

As reações de PCR *real time* foram preparadas de acordo com as seguintes proporções: 1,5 µL de água livre de RNase, 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* 2X, 1,0 µL de *10X PrimeTime Assay* (iniciadores/sonda) e 2,5 µL do cDNA proveniente da reação de transcrição reversa (diluído 1:4). O preparo e o armazenamento dos reagentes foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante, com volume final da reação de 10 µL.

Os endógenos *GUSB* e *TBP* foram avaliados para a escolha do controle endógeno. O gene *TBP* foi escolhido como normalizador da expressão gênica, levou-se em consideração o gene que apresentou menor oscilação entre as amostras do nosso experimento e por isso ele foi selecionado para as análises.

Os valores numéricos de Ct (*Cycle Threshold*) que indicam o número fracional de ciclos em que as quantidades de alvos amplificados atingem um limiar fixo, foram usados nos cálculos. O Ct é inversamente proporcional à quantidade de alvo amplificado na amostra. Todas as reações foram realizadas em triplicatas separadas para cada gene e a média das triplicatas foi calculada, e foi subtraído do Ct do gene endógeno:

$$\Delta C_t = C_t (\text{gene}) - C_t (\text{endógeno}) \quad (1)$$

O ΔC_t foi subtraído da amostra escolhida como calibrador, resultando no $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_t (\text{calibrador}) \quad (2)$$

A quantidade de alvos, normalizados para uma referência endógena e em relação a um calibrador, foi dada por:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3)$$

Nesse ensaio, as reações foram montadas em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems, Foster City, USA*), com as amostras amplificadas para os diferentes genes ocupando o mesmo poço em todas placas, assim, diminuindo a variabilidade entre a posição das amostras. As placas foram devidamente seladas com o *MicroAmp® Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Foster City, USA)* e centrifugadas a 100 x g 1 minuto. As placas foram então colocadas no aparelho utilizado para amplificação e detecção, o *StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)*. Utilizando-se o seguinte programa: incubação (2 min a 50 °C), ativação da polimerase (10 min a 95 °C), seguindo por quarenta ciclos de desnaturação do cDNA (15 segundos a 95 °C), anelamento dos iniciadores (1 min a 60 °C), finalizando com o resfriamento (10 min a 4°C).

Tabela 1. Sondas hidrolisadas utilizadas nas reações de Real Time qPCR.

Gene (Símbolo)	Gene (nome completo)	10 x PrimeTime assay
<i>RECQL</i>	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	Hs.PT.58.27119265
<i>BLM</i>	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	Hs.PT.56 ^a .4808866
<i>WRN</i>	Werner syndrome, RecQ helicase-like	Hs.PT.58.3388357
<i>RECQL4</i>	RecQ protein-like 4	Hs.PT.58.26841230.g
<i>RECQL5</i>	RecQ protein-like 5	Hs.PT.58.24767201
<i>PARP1</i>	poly (ADP-ribose) polymerase 1	Hs.PT.56 ^a .1129995
<i>APEX1</i>	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	Hs.PT.58 ^a .3182919
<i>POLβ</i>	polymerase (DNA directed), beta	Hs.PT.58.14431563
<i>TBP</i>	TATA box binding protein	Hs.PT.58v.39858774
<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta	Hs.PT.58v.27737538

3.7 Análise de comprimento telomérico

O comprimento telomérico de PBMCs provenientes de 15 indivíduos jovens, 15 indivíduos idosos e 8 centenários foi avaliado pelo ensaio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando o aparelho Rotor-Gene Q (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Este método permite medir o número de cópias de repetições teloméricas, em comparação com um gene de cópia única, utilizado como controle endógeno (Cawthon, 2002). Os procedimentos utilizados foram adaptados dos trabalhos de Cawthon, (2002)/ Callicott e Womack (2006). Para as reações de PCR, 8 µL de DNA com a concentração de 0,2 ng/µL (1,6 ng no total) e 12 µL de mix (2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA), 300 µM de cada primer (TEL *Foward*/ TEL *Reverse*) e água livre de nuclease (Qiagen, Valencia, CA, USA), para produzir uma reação de 24 µL. As reações do *single gene* (36B4) seguiram as mesmas condições de reagentes com diferença apenas nas concentrações dos *primers* 36B4 *Foward* (300 µM) e 36B4 *Reverse* (500 µM) (tabela 2).

As condições das reações no Rotor-Gene Q iniciaram para ambos os amplicons com incubação a 95 °C durante 5 min. Para PCR do telômero, seguiu-se com 25 ciclos de 98 °C durante 7s e 60 °C durante 10s. Para PCR 36B4, seguiu-se com 35 ciclos de 98 °C durante 7s e 58 °C durante 10s. Todas as reações de qPCR foram pipetadas na estação de trabalho robotizada Qiagility (Qiagen, Valencia, CA, USA). Uma amostra com comprimento telomérico conhecido serviu como referência

para preparação de duas curvas padrão (uma para 36B4 e uma para telômero), por meio de diluição seriada com seis pontos, variando de 10ng (1° ponto) a 0,3125ng (6° ponto). Os resultados obtidos apenas foram considerados se apresentassem reações com $R^2 \geq 0,99$. As amostras que não se enquadrarem dentro desta curva foram desprezadas.

O comprimento do telômero para cada amostra foi determinado usando a razão entre telômero e o *single gene* (razão T/S) com o cálculo do $\Delta Ct = Ct_{(\text{telômero})} - Ct_{(\text{single gene})}$. A razão T/S para cada amostra foi calibrada a partir da média da amostra de referência $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$, o comprimento telomérico (T/S) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Hematologia Experimental do HC-FMRP/USP, sob coordenação e colaboração do Prof. Drº Rodrigo T. Calado.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do Telômero e *Single Gene* (36B4) pelo método qPCR.

Primer	Sequência
36B4 F (<i>forward</i>)	5' – CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC – 3'
36B4 R (<i>reverse</i>)	5' – CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA – 3'
Tel F (<i>forward</i>)	5' – CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT – 3'
Tel R (<i>reverse</i>)	5' – GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT – 3'

3.8 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados da expressão gênica por qPCR e do comprimento telomérico foram realizadas por comparações pareadas entre os grupos jovens, idosos e centenários. Os testes estatísticos e gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA – www.graphpad.com). Nesse programa, foram utilizados os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, calculados em planilhas do Microsoft Office Excel (2013), a partir dos valores de exportados do *StepOne™ Real-Time PCR System* e Rotor-Gene Q (Qiagen).

Com o objetivo de verificar se as variáveis seguiram a distribuição normal, empregou-se a prova estatística *D'Agostino-Pearson omnibus K2*. Quando as distribuições dos dados não se aproximaram da distribuição normal, foi aplicado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney, caso contrário, o teste T não pareado com correção de *Welch* foi utilizado. Calculou-se a mediana, como estimador de medida de tendência central; além disso, foram calculados os quartis 1 e 3 que indicam a medida de dispersão. Aceitou-se significância estatística com $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da integridade das amostras de RNA

Inicialmente, avaliou-se a qualidade da integridade do RNA total extraído e purificado, sendo esse passo determinante para o sucesso do ensaio de RT-qPCR. As amostras de RNA total apresentaram níveis de pureza adequados após a quantificação com relação A260/A280 variando entre 1,8 - 2,0 e, com relação A260/A230, variando entre 1,8 - 2,1. Posteriormente, a integridade das amostras de RNA foi avaliada pela determinação dos valores de RIN. Foram consideradas amostras de boa integridade aquelas que apresentaram RIN maiores que 7. Em nosso estudo, as mostras de RNA apresentaram ótimo perfil de qualidade, como exemplificado na figura 3.

Figura 3. Densitometria da eletroforese microfluídica das amostras de RNA total.

Como exemplo, duas amostras de RNA de cada grupo do estudo (jovem, PJ2 e PJ3; idoso, PI2 e PI5; centenário, C14 e C15).

4.2 Expressão gênica transcricional

4.2.1 RecQ helicases

Os níveis de expressão dos genes da família RECQ helicase foram analisados para os três grupos de indivíduos em diferentes estágios do processo de envelhecimento: jovens, idosos e centenários.

Os resultados mostraram que os grupos compostos de idosos e centenários exibiram repressão significativa nos níveis de expressão do gene *BLM* quando comparados ao grupo de jovens ($p = 0,0157$, $p = 0,0057$; Figura 4C). Também observamos uma diminuição significativa nos níveis de expressão do gene *RECQL5* no grupo de idosos quando comparado com o grupo de jovens ($p = 0,0343$; Figura 4E). Em contraste, não foi observada tal repressão quando comparamos o grupo de centenários em relação ao grupo de jovens para o gene *RECQL5*. Os níveis de transcritos em relação aos genes *RECQL1*, *WRN* e *RECQL4* não mostraram alteração significativa nas comparações realizadas entre os grupos estudados (Figura 4A, 4B e 4D).

Figura 4. Expressão transcricional dos genes pertencentes a família RECQ helicasse em jovens, idoso e centenários avaliados por RT-qPCR.

Foram realizadas as comparações: grupo jovem *versus* idoso; jovem *versus* centenário. Para o gene *RECQL1* (A) na comparação entre o grupo jovem *versus* idoso, utilizou-se o teste t não pareado com correção de Welch, sendo que a comparação jovem *versus* centenário e as demais comparações realizadas para os genes *WRN* (B), *BLM* (C), *RECQL4* (D) e *RECQL5* (E), utilizou-se o teste Mann-Whitney. Os valores de expressão do gene TBP foram utilizados para normalizar os dados. As barras representam os valores de mediana. * valores significativos com $p < 0,05$.

Após a obtenção dos valores de expressão gênica relativa dos grupos estudados, foi realizado o cálculo de *fold change*, o qual corresponde ao número de vezes em que o gene se expressou diferencialmente (indução ou repressão) entre os grupos comparados, sendo determinados os valores para cada gene da família RecQ helicase (Figura 5).

Figura 5. Valores de *Fold-change* obtidos para genes pertencentes a família RecQ helicase.

Os valores foram obtidos pelo cálculo do logaritmo na base 2 dos valores encontrados pela razão das médias de expressão gênica transcricional dos grupos idoso e centenário, ambos divididos pela média encontrada no grupo jovem. Os valores de FC maiores que zero indicam indução da expressão, enquanto que valores negativos indicam repressão.

Ao observar os resultados de expressão gênica apresentados sob a forma de *fold change* pode-se notar uma repressão em todos os genes da família RecQ helicase para o grupo de idosos. Porém, é interessante notar que o grupo centenário apresenta uma pequena indução dos genes *RECQL1*, *RECQL4* e *RECQL5*, diferentemente da tendência de repressão apresentada pelo grupo idoso.

4.2.2 Genes de reparo do DNA

Os resultados da expressão dos genes *PARP1*, *POL β* e *APEX1* mostram uma repressão significativa de *PARP1* quando comparado o grupo idoso em relação ao grupo jovem ($P = 0,0473$; Figura 6A). Porém, não foi observado nenhum tipo de modulação de *PARP1* para a comparação do grupo centenário em relação ao grupo jovem. Para os genes *POL β* e *APEX1* foram realizadas as mesmas comparações, porém não foram observadas diferenças significativas, $p < 0,05$ (Figura 6B e 6C).

Figura 6. Perfis de expressão gênica transcricional analisados por RT-qPCR para os genes *PARP1* (A), *POL B* (B) e *APEX1* (C) em amostras obtidas de indivíduos jovens, idosos e centenários. Os valores de expressão do gene TBP foram utilizados para normalizar os dados. As barras representam os valores de mediana. * valores significativos ($p < 0,05$), teste Mann-Whitney.

Os valores de expressão gênica relativa obtidos para os genes *PARP1*, *POL β* e *APEX1* foram utilizados para o cálculo de *fold change* (Figura 7).

Figura 7. *Fold-change* de genes de reparo do DNA (*PARP1*, *POL β* e *APEX1*).

Os valores foram obtidos pelo cálculo do logaritmo na base 2 dos valores encontrados pela razão das médias de expressão gênica transcricional dos grupos idoso e centenário, ambos divididos pela média encontrada no grupo jovem. Os valores de FC maiores que zero indicam indução da expressão, enquanto que valores negativos indicam repressão.

Ao observar os resultados de expressão gênica apresentados sob a forma de *fold-change* nota-se uma tendência de repressão transcricional dos genes participantes da via BER, sendo a repressão associada ao aumento de idade (envelhecimento), embora tal resultado não tenha sido confirmado estatisticamente. Além disso, devemos ressaltar que a repressão dos genes de reparo do DNA em centenárias mostrou-se menos acentuada na comparação com níveis de repressão apresentados pelo grupo idoso, o que é muito interessante.

4.2.3 Curvas ROC

A curva de característica de operação do receptor (Curva ROC, do inglês *Receiver Operating Characteristic*), foi desenvolvida no campo das comunicações como uma forma de demonstrar as relações entre sinal-ruído. Interpretando o sinal como os verdadeiros positivos (sensibilidade) e o ruído, como falsos positivos (1-especificidade).

A Curva ROC corresponde a um gráfico de sensibilidade (ou taxa de verdadeiros positivos) *versus* taxa de falsos positivos. Essa curva permite evidenciar os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade que corresponde ao ponto em que se encontra mais próxima do canto superior esquerdo do diagrama, uma vez que o índice de positivos verdadeiro é 1 e o de falsos positivos é zero (SWETS, 1988). A área sob a curva do gráfico é a medida utilizada para poder medir o desempenho do teste aplicado. Quanto maior a capacidade do teste aplicado em separar os grupos de forma independente, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico. Nas comparações realizadas, não foram encontradas identidades nas comparações dos grupos indicados (figura 8).

Figura 8. Curvas ROC para a expressão gênica transcricional das RecQ helicases.

(A) Comparação do grupo jovem *versus* idoso para o gene *BLM*, área sob a curva (0,743). (B) Comparação do grupo jovem *versus* centenário para o gene *BLM*, área sob a curva (0,738). (C) Comparação do grupo jovem *versus* idoso para o gene *RECQL5*, área sob curva (0,713). (D) Comparação do grupo jovem *versus* idoso para o gene *PARP1*, área sob curva (0,700).

4.3 Medidas de comprimento telomérico

Inicialmente, avaliou-se a integridade (por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%) de 40 amostras de DNA do presente estudo (15 jovens, 15 idosos e 10 centenários) visando estudar o comprimento telomérico (Figura 9) antes de aplicar a metodologia de medição do comprimento telomérico. Após constatar a

qualidade das amostras, foram selecionados 15 indivíduos jovens (5 homens/ 10 mulheres) com a idade variando entre 18 e 16 anos ($\bar{x} = 22,9 \pm 2,3$); 14 indivíduos idosos (2 homens/ 12 mulheres) com idade variando entre 64 e 84 anos ($\bar{x} = 72,5 \pm 5,4$) e 8 centenários (3 homens/ 5 mulheres) com idade variando entre 100 e 101 anos ($\bar{x} = 100,4 \pm 0,5$).

Figura 9. Eletroforese de DNA em gel de agarose.

Avaliação da integridade do DNA das amostras de indivíduos jovens, idosos e centenários. Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo. Visualização em transiluminador UV. (M) marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; (J) indivíduos pertencentes ao grupo jovem; (I) indivíduos pertencentes ao grupo idoso; (C) indivíduos pertencentes ao grupo centenário.

Os resultados relativos aos comprimentos teloméricos, obtidos por qPCR, foram expressos na forma de uma razão Telômero/*Single gene* (T/S Ratio) em função da idade (Figura 10).

Figura 10. Valores do comprimento telomérico obtidos para indivíduos jovens, idosos e centenários em função da idade, avaliados por qPCR quantitativa.

Foi observada uma diferença significativa no comprimento telomérico dos grupos idosos e centenários quando comparados de forma pareada com o grupo jovem ($P = 0,0157$, $P = 0,0057$; Figura 11). Porém, conforme indicado na figura 11, apesar da queda contínua nos comprimentos teloméricos em função da idade, não foi observada diferença significativa na comparação grupo idoso *versus* grupo centenário ($P = 0,0621$).

Figura 11. Comparação entre o comprimento telomérico entre os grupos jovem, idoso e centenário. Para a comparação idoso *versus* jovem, utilizou-se o teste t não pareado com correção de Welch, sendo que a comparação centenário *versus* jovem e idoso *versus* centenário foi utilizado o teste Mann-Whitney. Os valores de expressão do gene *36B4* foi utilizado para normalizar os dados. As barras representam os valores de mediana. * Valores significativos com $p < 0,05$; ns, não significativo.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O principal motivo para os estudos no processo do envelhecimento humano é que a idade é o maior fator de risco para muitas doenças (Freita e Magalhães, 2011). O envelhecimento gradual da população mundial aumenta a necessidade de estudos sobre os mecanismos de envelhecimento, o qual implica em problemas médicos, sociais e econômicos pertinentes. No entanto, apesar da sua importância e considerável progresso nesta área nos últimos anos, o envelhecimento ainda é um processo misterioso, cuja causas fundamentais ainda não foram totalmente elucidadas.

As RecQ helicases compõem um grupo de proteínas que estão envolvidas em vários aspectos do metabolismo de DNA. Dentre suas funções, podemos citar seu papel na manutenção da integridade do genoma, principalmente por sua atuação em vias de reparo do DNA (Bohr, 2008; Chu e Hickson, 2009; Bernstein et al., 2010). Os sistemas de manutenção da integridade do genoma trabalham para manter a frequência de mutações espontâneas em um nível baixo, porém, os inevitáveis erros não lhes permitem suprimir a instabilidade do genoma totalmente (Li e Vijg, 2011). Consequentemente, mutações acumulam-se no genoma, sugerindo que essas mudanças são causadas por uma diminuição da eficiência do reparo de DNA, tornando-se menos eficiente e mais propenso a erros em idades avançadas (Gorbunova et al. 2007)

Tem sido proposto que os indivíduos que vivem até idades extremas (especialmente centenários) formam um grupo distinto, em termos de fatores genéticos que regulam a taxa de envelhecimento e longevidade (Polosak et al. 2011). Dessa forma, nosso trabalho teve como propósito esclarecer o papel das RecQ helicases e de algumas enzimas participantes da via BER no processo de envelhecimento, determinando os perfis de expressão gênica transcricionais de indivíduos jovens, idosos e centenários. Buscando relacionar a instabilidade genômica causada por danos oxidativos com possíveis falhas ou alterações nos processos de reparo do DNA, o que poderá fornecer subsídios para a melhor compreensão do envelhecimento humano.

As RecQ helicases interagem e modulam a atividade de proteínas que desempenham importantes papéis no reparo de DNA. Essas enzimas podem influenciar diretamente ou indiretamente o reparo por excisão de base, desempenhar um papel significativo no reparo de quebras duplas de DNA, mas ainda não foi totalmente esclarecido o seu papel sobre o reparo por excisão de nucleotídeo e sobre o reparo de mal pareamento de bases (Croteau et al. 2014).

Nossos resultados confirmaram que a expressão das RecQ helicases em idades avançadas mostra-se modulada quando comparada a indivíduos jovens. Foi observado que os grupos compostos de idosos e centenários exibiram repressão significativa nos níveis de expressão do gene *BLM*, quando comparados ao grupo de jovens. Ainda, o gene *RECQL5* também se mostrou reprimido no grupo idoso quando comparado ao grupo jovem. Os genes *RECQL1*, *WRN* e *RECQL4* não apresentaram nenhum tipo de modulação significativa em seus perfis de expressão gênica (mRNA).

A proteína BLM pode formar um complexo enzimático e atuar na resolução de estruturas alternativas na molécula de DNA, tais como quadruplex e de intermediários no DNA que surgem durante a recombinação homóloga (Singh, 2009). Outro importante papel desempenhado pela BLM ocorre no reparo da parada da forquilha de replicação durante o ciclo celular. Davalos et al (2004) demonstraram que em resposta ao tratamento com hidroxiuréia, um indutor de estresse replicativo, a enzima BLM foi localizada junto ao reparo da forquilha de replicação. Adicionalmente, foi relatado uma possível ação conjunta entre BLM e Topo III α na manutenção da estabilidade genômica. Hu et al (2001) trabalhando com extratos de a linhagem celular SV40-transformadas BS transfectadas, demonstrou a interação de BLM e Topo III α , por meio de ensaios de co-imunoprecipitação.

O gene *RECQL5*, também apresentou uma repressão no grupo idoso quando comparado ao grupo jovem. O papel biológico preciso da proteína RECQL5 em humanos ainda não é claro. Verificou-se que em Camundongos deficientes para o gene *RECQL5* ocorreu um aumento da instabilidade cromossômica (HU, 2009) e em *Caenorhabditis elegans* depletados para o gene *RECQL5* reduziu-se o tempo de vida comparado ao controle selvagem (Jeong et al. 2003). Speina et al (2010) realizaram um estudo no qual a proteína RECQL5 interagiu fisicamente com FEN1 e estimulou a atividade de clivagem de FEN1 em substratos do DNA, os quais são propostos como intermediários de replicação e reparo. É importante ressaltar que

outras enzimas participantes da via BER também foram avaliadas quanto sua associação com RECQL5. Entretanto, as proteínas POL β e APE1 não estimularam a atividade de catalítica FEN1 (Speina et al. 2010). Ainda focando na via BER, Todokoro et al. (2012) avaliaram a expressão de 10 genes relacionados a via BER (NEIL1, NTH1, OGG1, APE1, POL β , FEN1, LIG1, LIG3, XRCC1 e PARP1) em células RECQL5-*knockdown*, sendo que os genes XRCC1 e PARP1 mostraram uma redução nos níveis de expressão gênica transcricional. Conforme exposto, o gene *RECQL5* pode atuar como modulador de genes relacionados da via BER. Em nosso estudo, a repressão de *RECQL5* em indivíduos idosos pode possivelmente estar relacionado com a diminuição da expressão de *PARP1*, a qual também ocorreu no grupo de idosos em nosso estudo, quando comparado ao grupo jovem.

O resultado obtido em nosso trabalho para o gene *WRN* não demonstrou diferença significativa nos níveis de expressão gênica (mRNA) quando comparamos os grupos de idosos e centenários em relação ao grupo jovem. No entanto, a proteína WRN participa na manutenção da integridade do genoma, potencialmente contribuindo na regulação do processo de envelhecimento (Sild et al., 2006). A proteína WRN interage funcionalmente com PARP1, uma proteína com importante papel no BER. PARP1 ribosila um grande número de proteínas celulares, mas em células deficientes para WRN, PARP1 diminuiu seu nível de expressão, sugerindo que PARP1 é ativada ou estimulada por WRN (Harrigan, 2006).

Similarmente ao nosso estudo, Polosak et al (2011), determinaram o nível da expressão gênica de *WRN* em células mononucleares de sangue de 20 indivíduos jovens (22-37 anos), 18 indivíduos idosos (60-69 anos) e 17 indivíduos com idade superior a 90 anos. Diferente do resultado encontrado em nosso trabalho, o referido estudo, mostrou uma indução da expressão de *WRN* em indivíduos com idade superior a 90 anos. Não foi observada diferença significativa quando comparado o grupo idoso em relação ao grupo jovem (Polosak et al., 2011).

Em relação ao gene *RECQL4*, também não observamos alteração na expressão gênica (mRNA). O estudo de Schurman et al (2009), demonstrou que células de fibroblastos e células *knockdown* para o gene *RECQL4* acumularam maiores níveis de danos no DNA mensurados pelo ensaio do cometa em relação a células controles, em resposta ao dano causado por peróxido de hidrogênio. O mesmo estudo demonstrou que células RTS tem um nível basal elevado de 8-oxoG, sugerindo que a deficiência em RECQL4 pode ser associada com o reparo menos

eficiente de dano oxidativo. Ainda, com o intuito de correlacionar o envolvimento do gene *RECQL4* no reparo de dano oxidativo, Schurman et al (2009), demonstraram que *RECQL4* estimula a função enzimática de três proteínas da via BER (*APE1*, *POL β* e *FEN1*) *in vitro* e ainda, ocorreu a co-localização de *RECQL4* com *APE1* e *FEN1* no núcleo, em resposta a indução de dano oxidativo. Desse modo, parece provável que *RECQL4* pode promover o reparo de dano oxidativo, desempenhando papel significativo na ação de componentes da via BER.

Embora as doenças associadas com mutações nos genes da família RecQ helicase exibirem características distintas, elas são caracterizadas pelo aumento da incidência de câncer, o qual é atribuído as funções desempenhadas pelas RecQ helicases no reparo de DNA (Bernstein et al. 2010). Lao et al. (2013) demonstraram um aumento significativo nos níveis de expressão de *BLM* e *RECQL4* em amostras de câncer de colorretal quando comparadas a amostras correspondentes normais. No entanto, este mesmo trabalho demonstrou um decréscimo na expressão dos genes *RECQL1* e *RECQL5*, utilizando as mesmas amostras. Alterações nos níveis de expressão das RecQ helicases em células tumorais e de alta taxa de proliferação sugerem que elas podem desempenhar importantes papéis na resistência a agentes causadores de danos no DNA.

Por fim, com relação ao gene *RECQL1*, não observamos alterações em seus níveis de expressão gênica (mRNA) nos grupos de idosos e centenários, quando comparados ao grupo jovem. Apesar de não haver nenhum relato da ligação entre mutações em *RECQL1* e uma doença humana, fenótipos celulares associados com deficiência de *RECQ1* em humanos e roedores indicam que *RECQ1* tem um papel importante na integridade genômica (Wu e Brosh, 2010). Provavelmente, devido à ausência da relação dessa RecQ helicase com doenças humanas, poucos estudos foram realizados na busca do papel de *RECQL1* na manutenção da integridade genômica.

As RecQ helicases, especialmente *BLM* e *WRN*, estão envolvidas na manutenção dos telômeros (Opresko, 2008). Entretanto, Sharma et al (2007) analisaram envolvimento de *RECQL1* na manutenção dos telômeros em esplenócitos e timócitos de camundongos *knockout* para o gene *RECQL1*. Não houve diferenças no comprimento dos telômeros avaliado por FISH e citometria de fluxo, entre os três genótipos estudados *Recql*^{+/+}, *Recql*^{+/-}, e *Recql*^{-/-}. Neste mesmo trabalho, as células deficientes em *RECQL1* mostraram um aumento na quantidade

de danos no DNA, tal como exemplificado pelo acúmulo γ -H2AX foci, um marcador para quebras de dupla fita.

Uma importante característica das RecQ helicases é a sua capacidade de reconhecer e desenrolar uma grande variedade de estruturas formadas no DNA. Em particular, tem sido sugerido que BLM e WRN desempenham um papel significativo no metabolismo de estruturas conhecidas como G-quadruplex (G4) durante a replicação cromossômica e telomérica (Edwards, 2014; Nguyen, 2014, Chatterjee, 2014). A molécula de DNA pode adotar várias conformações alternativas baseado em sua sequência e interações com várias outras proteínas. Como exemplo dessas estruturas alternativas conhecidas, podemos citar as G4. Elas são compostas por pilhas planares de quatro guaninas interagindo por ligações de hidrogênio Hoogsteen. Recentemente, as G-quadruplex tem atraído bastante interesse, e existem evidências de que elas são formadas *in vivo* e podem afetar o DNA (Bochman, 2012). Devido à alta concentração de guaninas na sequência telomérica, tem sido sugerido a formação das estruturas G-quadruplex. Estudos *in vitro* já demonstraram que WRN pode resolver algumas estruturas alternativas, assim como atuar na resolução do *T-loop* telomérico (Crabbe, 2004).

No presente trabalho, foi avaliado o comprimento telomérico de leucócitos em diferentes estágios do processo de envelhecimento. Verificou-se uma correlação inversamente proporcional entre o comprimento telomérico de indivíduos jovens e idosos comparado a indivíduos centenários em relação a idade. Porém, não foi demonstrada essa mesma correlação quando se comparou o grupo idoso em relação ao grupo centenário.

O acúmulo de dano oxidativo é considerado um dos candidatos causadores do envelhecimento (Møller et al., 2010). Além disso, enquanto quebras no DNA genômico são reparadas rapidamente, o reparo de quebras equivalentes nos telômeros é mais lento e incompleto (Petersen et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstram que devido à alta concentração de guanina no DNA telomérico, essa porção da molécula de DNA torna-se propensa ao dano oxidativo. A guanina é a base nitrogenada com menor potencial de oxidação. Dessa maneira, o DNA telomérico é susceptível ao dano oxidativo, apresentando lesões como 8-Oxoguanina (8-OxodG) (Singh, 2012). Alguns trabalhos têm demonstrado a associação entre dano oxidativo e o encurtamento telomérico. Satoh et al (2008) analisaram a relação entre o encurtamento telomérico e dano oxidativo em células

progenitoras endoteliais obtidas de indivíduos com doença coronária arterial com ou sem síndrome metabólica. O comprimento telomérico e a atividade da telomerase foi significativamente reduzida nos indivíduos com doença coronária arterial comparados a controles sadios de mesma idade. Além disso, foi observado que indivíduos com síndrome metabólica apresentaram maiores níveis dano oxidativo comparados a não portadores dessa síndrome.

Além de avaliar o comprimento dos telômeros em diferentes estágios do envelhecimento, nosso estudo também buscou associar a expressão de genes da família RecQ helicase no reparo de dano oxidativo nos telômeros, por meio da expressão de três genes participante da via BER (*PARP1*, *POL β* e *APEX1*). Nossos resultados mostraram uma repressão significativa na expressão do gene *PARP1* em indivíduos idosos comparados a indivíduos jovens. Evidenciando uma possível associação entre a diminuição do reparo de danos oxidativos no DNA telomérico de indivíduos idosos, resultando em telômeros encurtados, como observado em nosso estudo. Ainda, observamos que o grupo de indivíduos centenários não apresentou alterações na expressão dos genes relacionados a via BER. A figura 7, mostra os valores de *fold change* para os grupos de idosos e centenários em relação ao grupo jovem. Podemos observar que coletivamente os genes da via BER têm uma tendência de repressão em ambos os grupos. Além disso, essa tendência de repressão é menor no grupo de centenários comparado a tendência de repressão do grupo idosos para os três genes avaliados. Portanto, essa menor tendência poderia estar relacionada com a ausência de diferença no comprimento telomérico entre centenários e idosos encontrada em nosso estudo.

Bischoff et al. (2005) analisaram o comprimento telomérico de 287 pares de gêmeos, com idade variando entre 73 a 94 anos, foi observado que mulheres tem telômeros maiores do que homens, e que mulheres têm uma correlação do encurtamento telomérico com a idade maior do que os homens. Além disso, Atzmon et al. (2010) avaliaram o comprimento telomérico de três grupos distintos: 86 indivíduos com longevidade excepcional (95-105 anos, centenários), 175 filhos dos indivíduos centenários (44-85 anos) e de 93 controles com idade pareada aos filhos de centenários (43-94 anos), sem histórico familiar de longevidade. Esse trabalho demonstrou que centenários e seus filhos têm telômeros significativamente mais longos do que os controles não relacionados, sugerindo assim, que a característica do comprimento telomérico é hereditária. Além disso, foi observado que os

descendentes de centenários não mostraram uma relação entre o aumento da idade e o encurtamento telomérico, como foi observado no grupo de idosos sem parentesco com os centenários. O encurtamento telomérico tem sido associado a doenças que estão ligadas ao envelhecimento, como hipertensão, diabetes, obesidade, arteriosclerose e demência (Fitzpatrick et al. 2007). Atzmon et al. (2010) demonstraram que telômeros mais longos são associados a menor prevalência de hipertensão, diabetes tipo 2 e com melhor função cognitiva, bem como com perfis lipídicos saudáveis. Similarmente, outros autores têm buscado relacionar alguns fatores ao comprimento dos telômeros, tais como hábitos de fumar e consumir álcool (Bedix et al., 2014), atividade física (Cherkas et al., 2008), status sócio-econômico (Woo et al., 2009) e terapia de reposição hormonal (Lee et al., 2005).

O gênero é outro importante fator que afeta o comprimento dos telômeros. Têm sido relatado na literatura que as mulheres vivem mais do que os homens em todas as faixas etárias. Na população em geral, 75% e 90% das pessoas com idade superior a 100 e 110 anos, respectivamente, são mulheres (Blagosklonny, 2010). Essa desigualdade sexual na expectativa de vida é refletida nos telômeros. Não são observadas diferenças no comprimento dos telômeros entre os sexos ao nascimento, porém ao longo dos anos, os homens apresentam telômeros mais curtos do que mulheres, indicando que os telômeros de indivíduos do sexo masculino tendem a se encurtar mais rápido (Barrett e Richardson, 2011). Entretanto, Hunt et al (2008) observaram que não houve diferença no comprimento dos telômeros de homens e mulheres com idade entre 19-37 anos, ainda, nesse mesmo estudo, foi observado em outro grupo de indivíduos com idade entre 30-93 anos que mulheres apresentaram telômeros mais longos do que homens. Desse modo, a associação entre sexo e comprimento dos telômeros pode variar de acordo com a idade. Assim, levando em consideração que o envelhecimento humano é associado com o acúmulo de danos oxidativos, é pertinente a ideia de que o comprimento dos telômeros pode refletir não só a capacidade proliferativa de uma célula, mas também evidenciar o acúmulo de danos oxidativos. Desse modo, o presente trabalho apresentou diferenças no comprimento telomérico e na expressão de genes da família RecQ helicase e participantes na via BER helicase, como por exemplo, *RECQL5*, *BLM* e *PARP1*. Novos estudos são necessários para a melhor compreensão do papel desempenhado por danos oxidativos e vias de reparo no processo de envelhecimento.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicaram uma associação do processo de envelhecimento com a modulação de alguns genes da família RecQ helicase e participantes da via BER, e com o encurtamento telomérico. Embora o número de indivíduos estudado seja pequeno, esses resultados sugerem que alterações nos perfis transcricionais da família RecQ helicase e participantes da via de reparo por excisão de base possam atuar no processo de envelhecimento. Os resultados gerados nesse trabalho são inéditos, sendo relevantes para melhor compreensão do processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- d'Adda di Fagagna, F.; Reaper, P.M.; Clay-Farrace, L.; Fiegler, H. e Carr, P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature** 426, 194.
- Ahn, B.; Harrigan J. A; Indig F. E; Wilson, D. M. e Bohr, V. A. (2004) Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. **J. Biol. Chem.** 279: 53465–74.
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. **J Reprod Infertil.** 14(4):158-172.
- Allshire, R. C. et al. (1988) Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. **Nature** 332, 656–659 (1988).
- Armanios, M e Blackburn, E. H. (2012) The telomere syndromes. **Nature Reviews** 13: 693-704.
- Atzmon, G.; Cho, M. et al. (2010) Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. **PNAS** 107: 1710–1717.
- Barrett, E. L. B. e Richardson, D. S. (2011). Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell*, 10(6), 913–21.
- Bachrati, C. Z. e Hickson, I. D. (2008) RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. **Chromosoma** 117:219–233.
- Balasingham, S. V; Zegeye, E. D; Homberset; H.; Rossi, M. L.; Laerdahl, J. K. et al. (2012) Enzymatic Activities and DNA Substrate Specificity of Mycobacterium tuberculosis DNA Helicase XPB. **PLoS ONE** 7(5): e36960.
- Bohr, V. A. (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. **Trends Biochem. Sci.** 33, 609– 620.

- Bernstein K. A.; Gangloff, S. e Rothstein, R. (2010) The RecQ DNA Helicases in DNA. **Repair Annu. Rev. Genet.** 44:393–417.
- Bischoff, C.; Graakjaer, J. (2005) The Heritability of Telomere Length Among the Elderly and Oldest-Old. **Twin Research and Human Genetics** 8: 433–439.
- Bochman, M. L.; Paeschke, K. e Zakian, V. A. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. **Nat. Rev. Genet.** 13, 770–780.
- Brosh, R. M. Jr e Bohr, V. A. (2007) Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. **Nucleic Acids Research** 35 (22): 7527–7544.
- Brosh, R. M. Jr (2013) DNA helicases involved in DNA repair and their roles in câncer. *Nature Rev.* **Cancer** 13; 542:558.
- Blackburn, E. H.; Greider, C. W. e Szostak, J. W. (2006) Telomeres and telomerase : the path from maize , Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. **Nature Medicine** 12(10): 1133–1138.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, câncer and beyond. **Nat. Rev. Genet.** 6: 611–622.
- Blagosklonny, M. V. (2010). Why men age faster but reproduce longer than women : mTOR and evolutionary perspectives. *Aging*, 2(5).
- Cairney, C. J., & Keith, W. N. (2008). Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. **Biochimie** 90(1), 13–23.
- Calado, R. T. (2009) Telomeres and marrow failure. **Hematology** 338-343.
- Calado, R. T. e Young, N. S (2009) Telomere Diseases. *n engl j med* 361;24

- Callicott, R. J. e Womack, j. E. (2006) Real-time PCR Assay for Measurement of Mouse Telomeres. Comparative. **Medicine** 56: 17-22.
- Campisi, e Vijg, j. (2009) Does Damage to DNA and Other Macromolecules Play a Role in Aging? If So, How?. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 64A (2): 175–178.
- Caruso, C.; Passarino. G.; Puca, A. e Scapagnini, G. “Positive biology”: the centenarian lesson. **Immunity & Ageing** 9:5.
- Cawthon, R. M. (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Research** 30 (10): 1-6.
- Chatterjee, S.; Zagelbaum, J. et al. (2014) Mechanistic insight into the interaction of BLM helicase with intra-strand G-quadruplex structures. **Nature communications** | 5:5556.
- Chomczynski, P. A. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Bio techniques** 15: 532-537.
- Christensen, K.; Johnson, T. E. e Vaupel, J. W. (2006) The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. **Nat Rev Genet.** 7(6): 436–448.
- Christensen, K.; Doblhammer, G.; Rau, R. e Vaupel, J. W. (2009) Ageing populations: the challenges ahead. **Lancet** 374: 1196–208.
- Croteau, D.L.; Popuri, V.; Opresko, P. L e Bohr, V. A. (2014) Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication. **Annu. Rev. Biochem.** 83: 9.1–9.34.
- Chu, W. K. e Hickson, I. D. (2009) RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. **Nature Reviews** 9: 644-654.

David S. S., O'Shea, V. L. e Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature** 447: 941–950.

Debrabant, B.; Soerensen, M.; Flachsbart, F. et al. (2014) Human longevity and variation in DNA damage response and repair: study of the contribution of sub-processes using competitive gene-set analysis. **European Journal of Human Genetics**, 1-6.

De Lange, T. (2009) How Telomeres Solve the End-Protection Problem. **Science** 326: 948-952.

Edwards, D. N.; Orren, D. K. e Machwe, A. (2014) Strand exchange of telomeric DNA catalyzed by the Werner syndrome protein (WRN) is specifically stimulated by TRF2. **Nucleic Acids Res.** 42, 7748–7761.

Finkel, T. (2012). Signal transduction by mitochondrial oxidants. **J. Biol. Chem.** 287: 4434-4440.

Freitas, A. A. e Magalhães, J. P. (2011) A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. **Mutation Research** 728: 12–22.

Fitzpatrick, A. L.; Kronmal, R. A. et al. (2007) Leukocyte Telomere Length and Cardiovascular Disease in the Cardiovascular Health Study. **American Journal of Epidemiology Am J Epidemiol** 165: 14–21.

Handy, D. E. e Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. **Antioxid. Redox Signal** 16: 1323–1367.

Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **EMBO Journal** 27 (4): 589–605

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford University Press.

Hayflick, L. e Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, 25, 585–621.

He, W.; Sengupta, M.; Velkoff, V.A. e DeBarros, K.A. (2005) 65+ in the United States: 2005. U.S. Census Bureau.

Hjelmborg J. V. b.; Iachine, I.; Skytthe, A. et al. (2006) Genetic influence on human lifespan and longevity. **Hum Genet** 119: 312–321.

Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine** 361 (15): 1475–1485.

Hung, C.; Chen, Y.; Hsieh, W. et al. (2010) Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews** 9S: S36–S46.

Jirtle, R. L. e Skinner, M. K. (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics** 8 (4): 253–262.

Kobbe, V. C., Harrigan, J. A., May, A., Opresko, P. L., Dawut, L. et al. (2003). Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosylation) pathway after DNA damage. **Mol. Cell. Biol** 23: 8601–13.

Kong, C. M.; Lee, X. W. e Wang, X. (2013) Telomere Shortening in Human Diseases. **FEBS J.** 280(14):3180-93

Kolovou, G. D.; Kolovou, V. e Mavrogeni, S. (2013) We Are Ageing. **BioMed Res. Inter.** 1-12.

Klungland, A. e Lindahl, T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with proteins and requirement for DNase IV (FEN1). **Embo J** 16(11): 3341-3348.

German, J. (1997) Bloom's syndrome. XX The first 100 cancers. **Cancer Genet Cytogenet** 93:100–106.

Gorbunova, V.; Seluanov, A.; Mao, Z. (2007) Changes in DNA repair during aging. **Nucleic Acids Research** 35: 7466–7474

Greider, C. W. e Blackburn, E. H. (1988) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. **Cell** 43: 405-13.

Ghosh, A.; Liu, Y e Bohr, V. A. (2010) P.D. Adams and J.M. Sedivy (eds.), Cellular Senescence and Tumor Suppression. 212p.

Gardner, M.; Bannb, D.; Wiley. L. (2014) Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. **Experimental Gerontology** 51 (2014) 15–27.

Jeong, S. Y.; Kang, Y. et al. (2003) Deficiency of *Caenorhabditis elegans* RecQ5 homologue reduces life span and increases sensitivity to ionizing radiation. **DNA Repair** 2 (2003) 1309–1319.

Lao, V. V.; Welcsh, P. et al. (2013) Altered RECQ Helicase Expression in Sporadic Primary Colorectal Cancers. **Translational Oncology** 6: 458–469.

Lee, O.; Kim, H.; He, Q. et al. (2011) Genomewide YFP Fluorescence Complementation Screen Identifies New Regulators for Telomere Signaling in Human Cells. **Mol Cell Proteomics** 10(2): M110.001628.

Li, W. e Vijg, J. (2013) Measuring Genome Instability in Aging – A Mini-Review. **Gerontology** 58:129–138.

Lingner, J. (1997). Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. **Science**, 276(5312).

Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A. e Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Phcog Rev** 4:118-126.

Long, S. O. (2012) Bodies, Technologies, and Aging in Japan: Thinking About Old People and Their Silver. **Products J Cross Cult Gerontol** 27:119–137.

- López-Otín, C.; Blasco, M. A.; Partridge, L. et al. (2013) The Hallmarks of Aging. **Cell** 153 (6): 1194-1297.
- Mitchell J. R.; Wood, E. e Collins, K (1999) A telomerase componente is defective in the human disease dyskeratosis congenita. **Nature** 402: 551–555
- Miller, D. M.; Buettner, G. R. e Aust, S. D. (1990) Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Radic. Biol. Med** 8, 95–108.
- Mora, M.; Perales, M. J.; Serra-Prat, M. et al. (2011) “Aging phenotype and its relationship with IGF-I gene promoter polymorphisms in elderly people living in Catalonia,”. **Growth Hormone and IGF Research** 21 (3): 174–180.
- Monaghan, P. e Haussmann, M. F. (2006) Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan?. **TRENDS in Ecology and Evolution** 21: 47-53.
- Moyzis, R. K. et al. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 6622–6626.
- Muller, H.J. The remaking of chromosomes. **Collecting Net** 13, 181–198 (1938).
- Müezzínlera, A.; Zaineddina, A. K. e Brennera, H. (2013) A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. **Ageing Research Reviews** 12: 509–519.
- Newman, J. P. A.; Banerjee, B. (2008) Short Dysfunctional Telomeres Impair the Repair of Arsenite-Induced Oxidative Damage in Mouse Cells. **Journal of cellular physiology**, 706-809.
- Newman, A. B. e Murabito, J. M. (2013) The Epidemiology of Longevity and Exceptional Survival. **Epidemiol Rev** 35:181–197.

- Nguyen, G. H. et al. (2014) Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 111, 9905–9910.
- Olovnikov, A. M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, 201(6), 1496–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5158754>
- Olovnikov, a M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **Journal of Theoretical Biology** 41(1), 181–190.
- Opresko, P. L. (2008) Telomere ResQue and preservation—roles for the Werner syndrome protein and other RecQ helicases. **Mech. Ageing Dev.** 129: 79–90.
- Otterlei, M.; Bruheim, P.; Ahn, B. et al. (2006) Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest. **Journal of Cell Science** 119: 5215.
- Perls, T. T.; Wilmoth, J.; Levenson, R. et al. (2002) Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. **PNAS** 99: 8442–8447.
- Polosak, J.; Kurylowicz, A. et al. (2011) Aging Is Accompanied by a Progressive Decrease of Expression of the *WRN* Gene in Human Blood Mononuclear Cells. **Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 66A(1): 19–25.
- Popuri, V. et al. (2008) The Human RecQ Helicases, BLM and RECQ1, Display Distinct DNA Substrate Specificities. **J. Biol. Chem** 283:17766-17776.
- Rossi, M.L. et al. (2010) Conserved helicase domain of human RecQ4 is required for strand annealing-independent DNA unwinding. **DNA Repair** 9: 796–804.

Samassekou, O.; Gadji, M.; Drouin, R. e Yan, J. (2010) Sizing the ends: Normal length of human telomeres. **Annals of Anatomy** 192: 284–291.

Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L. A.; Unsal-Kacmaz, K e Linn S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu Rev Biochem** 73: 39-85.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** 82: 291–295.

SILD, M.; KOCA, C. et al. (2006) Possible Associations between Successful Aging and Polymorphic Markers in the Werner Gene Region. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1067: 309–310.

Siitonen, H.A. et al. (2009) The mutation spectrum in RECQL4 diseases. **Eur J Hum Genet** 17: 151-8.

Singh, D. K.; Ahn, B. e Bohr, V. A. (2009) Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. **Biogerontology**. 10(3): 235–252

Singh, D. K.; Ghosh, A. K.; Croteau, D. L. e Bohr, V. A. (2012) RecQ helicases in DNA double strand break repair and telomere maintenance. **Mutation Research** 736: 15-24.

Singleton, M.R. e Wigley, D.B. (2002) Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. **J. Bacteriol.** 184: 1819–1826.

Soerensen, M.; Dato, S.; Tan, Q. et al. (2013) Evidence from case–control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in APOE, CETP, and IL6 with human longevity. **AGE** 35: 487–500.

Sousa, F. G.; Matuo, R.; Soares, D. G.; Escargueil, A. E.; Henriques, J. A. et al. (2012) PARPs and the DNA damage response. **Carcinogenesis** 33: 1433–40.

Steven C. Hunt, S. C.; Chen, W. et al. (2008) Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell* 7: pp451–458.

Speina, E.; Dawut, L.; Hedayati, M. et al. (2010) Human RECQL5beta stimulates flap endonuclease 1. **Nucleic Acids Res.** 38: 2904–2916.

Swets, J. A. (1988) Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. **Science** 240: 1285-1293.

Sharma, S.; Doherty, K. M. e Brosh, R. M. Jr (2006) Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. **Biochem. J.** 398: 319–337.

Sharma, S.; Stumpo, D. J. et al. (2007) RECQL, a Member of the RecQ Family of DNA Helicases, Suppresses Chromosomal Instability. **Molecular and cellular biology**, 1784–1794

Schurman, S. H.; Hedayati, M.; Wang, Z.; Singh, D. K.; Speina, E. et al. (2009) Direct and indirect roles of RECQL4 in modulating base excision repair capacity. **Hum. Mol. Genet.** 18: 3470–83.

Tadokoro, T.; Ramamoorthy, M. et al. (2012) Human RECQL5 participates in the removal of endogenous DNA damage. **MBoC** 23: 4273-4285.

Thomas, C. e Tulin, A. V. (2013) Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes. **Mol. Asp. Med.** 34: 1124–37.

Umate, P.; Tuteja, N. e Tuteja, R. (2011). Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. **Commun. Integr. Biol** 4: 118–137.

United-Nations (2011) “World Population Prospects: The 2010 Revision.” Dept. of Economic and Social Affairs, **United Nations**, New York.

- Valko, M. e Leibfritz, D. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 39: 44–84.
- Vindigni, A.; Marino, F. e Gileadi, O. (2010) Probing the structural basis of RecQ helicase function. **Biophysical Chemistry** 149: 67–77.
- Van Loon B., Markkanen, E. e Hu"bscher, U. (2010). Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair** 9: 604–616.
- Von Hippel, P.H. (2004) Helicases become mechanistically simpler and functionally more complex. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 11: 494–496.
- Von Zglinicki, T. e Martin-Ruiz, C. M. (2005) Telomeres as Biomarkers for Ageing and Age-Related Diseases. **Current Molecular Medicine** 5: 197-203.
- Wang, D., Luo, M. e Kelley, M. R. (2004) Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. **Mol. Cancer Ther.** 3: 679–86.
- WATSON, J. D., e CRICK, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature** 171(4356): 737–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13054692>.
- Wu, L.; Davies, S. L.; Levitt, N. C. e Hickson, I. D. (2001) Potential Role for the BLM Helicase in Recombinational Repair via a Conserved Interaction with RAD51. **The Journal of Biological Chemistry** 276 (22): 19375–19381.
- Wu, Y. e Brosh, R. (2010) Distinct roles of RECQ1 in the maintenance of genomic stability. **DNA Repair** 9: 315–324
- Zakian, V. A. (2012) Telomeres: the beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Experimental Cell research* 318: 1456-1460.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2014

Ofício nº 3832/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 13966/2014

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“PERFIS TRANSCRICIONAIS DE GENES DA FAMÍLIA RECQ HELICASE E SUA RELAÇÃO COM O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E DOENÇA DE ALZHEIMER”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 396ª Reunião Ordinária realizada em 13/10/2014, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

JOÃO PAULO LOPES DA SILVA

PROFª DRª ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO (Orientadora)

Depto. de Genética – FMRP-USP

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos indivíduos jovens e idosos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana da Silva Leandro

ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Bloco G

Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Telefone: (16) 3315-3082

Convidamos o senhor(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA DOS LINFÓCITOS DE IDOSOS PORTADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER, IDOSOS SADIOS E JOVENS.

A pesquisa será realizada pela bióloga pós-graduanda em nível de mestrado, Giovana da Silva Leandro, aluna do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, que realizará um estudo sobre a Doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença em que os neurônios aos poucos vão morrendo, afetando a memória dos portadores, o que os leva a dependência da família. Este estudo tem como finalidade a compreensão das causas que podem levar ao desenvolvimento da doença. As células presentes no sangue colhido serão submetidas a uma série de testes capazes de detectar alterações no material genético, na tentativa de encontrar fatores em comum nos pacientes de Alzheimer e diferenciá-los dos indivíduos sadios. Assim, esperamos conseguir resultados que possam contribuir para o entendimento da doença, embora o presente estudo não deva beneficiar diretamente os participantes.

Para a realização desta pesquisa é necessária a participação de pessoas sadias que não apresentam a doença de Alzheimer, para podermos comparar os resultados entre os grupos sadios (controle) e doentes (com a doença de Alzheimer). Sendo este o termo de consentimento livre e esclarecido dirigido aos voluntários sadio, a pesquisadora declara que não prevê qualquer benefício direto ao voluntário com relação à sua participação no estudo.

Assim, caso concorde em participar da realização da nossa pesquisa, faz-se necessária a coleta de 20ml de sangue periférico (o equivalente duas colheres de sopa), por punção venosa, que será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

- 1) O voluntário terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- 2) Terá a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
- 3) Será mantido o compromisso de que o voluntário não será identificado, sendo que a participação terá caráter confidencial;
- 4) Será mantido o compromisso de proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Todos os exames de sangue serão coletados com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de sangue será feita com material descartável, sendo necessária apenas uma punção da veia do braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável e impor um risco mínimo, mas apenas pela “picada” com a agulha;
- 6) Não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
- 7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Para esclarecer quaisquer dúvidas, telefonar para (16) 3602-3082 ou 3602-3827 e falar com Giovana S. L. (pós-graduanda) ou com a Professora Elza T. Sakamoto Hojo (orientadora da aluna).
Endereço: Departamento de Genética, bloco G, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Avenida Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Giovana da Silva Leandro

Eu, _____, portador do
R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações
supra citadas, ciente dos meus direitos acima relacionados e diante dos esclarecimentos prestados,
concordo em participar da pesquisa na qualidade de voluntário.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos indivíduos centenários

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de nome: **“Estudo dos Centenários de Ribeirão Preto - Brasil”**.

Esta pesquisa tem como objetivo estudar a população de centenários de Ribeirão Preto, identificando eventuais fatores protetores do ponto de vista ambiental, orgânico e genético que contribuem para o processo do envelhecimento bem sucedido em nossa população.

Para participar deste estudo é necessário que o voluntário possa confirmar, através de documentação original (carteira de identidade, título de eleitor, certidão de casamento) a sua data de nascimento.

Os pacientes serão visitados por, pelo menos, um médico e um técnico de enfermagem e toda a avaliação será realizada no domicílio do participante em uma ou até duas visitas com cerca de 4 horas de duração na 1ª visita.

Será solicitado jejum à partir das 00:00 (zero horas) do dia da avaliação. A visita começara as 8:00 hs. Serão coletados 15 ml sangue (3 colheres de sopa) através da de uma veia do braço por um técnico de enfermagem. O voluntário poderá sentir dor durante a picada da agulha. Após esse procedimento, será colhida a saliva do paciente através de um algodão colocado na boca por um pequeno tempo. Após a coleta da saliva, o paciente deverá tomar uma água especial, mas que tem as mesmas características (cor, sabor e cheiro) da água comum e será liberado para o café da manhã.

Serão realizadas também avaliações clínicas, cognitivas, aplicação de escalas, entrevistas estruturadas com o paciente e/ou cuidador principal. Serão feitas medidas corporais de peso, altura e medidas do corpo com fita métrica, avaliação da força do paciente e testes de caminhada nos voluntários que andam. Serão feitas 3 medidas da pressão arterial em cada braço. No final da consulta será repetido o procedimento no braço com maior pressão.

Nenhum dos procedimentos realizados trarão malefícios à saúde do participante.

Ao final do estudo o participante e/ou seu responsável legal receberão informações sobre todos os resultados obtidos nestes exames, com cópias para outros médicos, se solicitado for.

Os seus direitos ao participar da pesquisa, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, são:

A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que será submetido;

A liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação de seu atendimento e tratamento habitual neste serviço;

A segurança de não ser identificado (a) e do caráter confidencial de toda a informação relacionada.

Ciente e de acordo: _____ Ribeirão Preto, ____/____/____

Nome do participante : _____

RG nº _____

(Assinatura do participante da pesquisa ou de seu responsável legal)

Pesquisador principal: Paulo de Oliveira Duarte / Mariana Garcia da Freiria

Assinatura: _____

Orientadora: Nereida Kilza da Costa Lima

Assinatura: _____

Testemunha: _____

Assinatura: _____

Telefones para contato:

Paulo Duarte: 8121-1081 / 3234-6999

Dra. Nereida: 9277-0522