**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-
TRONCO E TERAPIA CELULAR- FMRP- USP RIBEIRÃO PRETO**

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias
agudas e telomeropatias**

Ribeirão Preto

2019

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

LEONARDO CAMPOS ZANELATTO

**Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias
agudas e telomeropatias**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Células-tronco e Terapia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado
De Saloma Rodrigues

Ribeirão Preto

2019

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.

Zanelatto, Leonardo Campos

Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias agudas e telomeropatias. Ribeirão Preto, 2019.

62 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Rodrigues, Rodrigo do Tocantins Calado De S.

1. Telômeros. 2. TERRA. 3. Leucemias 4. Telomeropatias. 5. R-loops

Nome: ZANELATTO, Leonardo Campos

Título: Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias agudas e telomeropatias

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Células-tronco e Terapia Celular

Aprovado em: 07/06/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Instituição: FM- USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Instituição: FFCLRP- USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Phillip Scheinberg

Instituição: Hospital Beneficência Portuguesa- SP

Julgamento: Aprovado

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - (FAPESP) - Processo nº 2013/24199-0.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por mais essa conquista. Ele que sempre me dá muito mais do que eu mereço. Sempre me surpreendendo e, dessa forma, me incentivando a seguir em frente com força e coragem, e mostrando que todo esforço vale a pena. Muito obrigado Deus, não apenas por mais essa etapa concluída, mas por tudo que tenho na minha vida!

Muito obrigado ao meu orientador, Rodrigo T. Calado, por aceitar me orientar desde 2013. Obrigado por ser meu guia no caminho de como se tornar um profissional melhor, ser um exemplo de pesquisador, do qual tenho grande respeito e admiração! Obrigado por toda dedicação, confiança e paciência nessa caminhada.

Muito obrigado à Universidade de São Paulo (FMRP- USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia clínica, Células-tronco e Terapia celular da Fundação Hemocentro, por permitirem que eu desenvolvesse esta tese.

Muito obrigado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Processo nº2013/24199-0) pela bolsa concedida durante o doutorado e pelo financiamento fornecido, que permitiu que este projeto fosse desenvolvido.

Aos meus pais, quero agradecer sinceramente por tudo! Por todo apoio, todo carinho, toda dedicação que tenho recebido desde sempre. Amo vocês incondicionalmente e dedico esse trabalho a vocês. Sem o apoio de vocês com certeza eu não teria chegado até aqui. Obrigado mãe, por ser meu porto-seguro sempre!

À Nathália, meu amor, muito obrigado por ter me apoiado em todos os momentos, sempre me escutando e me aconselhando. Muito obrigado por toda paciência e por todo carinho e amor que tem me dado sempre! Obrigado por escutar meus desabafos, minhas frustrações, meus anseios, por me apoiar em minhas escolhas e sempre conseguir colocar um sorriso no meu rosto. Te amo muito!

Bárbara: Muito obrigado pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas e por toda ajuda nesse trabalho. Agradeço imensamente por tudo!

JP, Flavinha, Flor e André: Muito obrigado pelos momentos de descontração e por toda ajuda nesse trabalho. Muito obrigado pela companhia e amizade!

Meus sinceros agradecimentos a todos!

RESUMO

ZANELATTO, L.C. **Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias agudas e telomeropatias**. 2019. 62f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP, 2019.

Telômeros são estruturas que possuem como função proteger as extremidades dos cromossomos lineares e manter a integridade genômica. Mutações constitutivas que interferem nos mecanismos de manutenção do comprimento dos telômeros podem levar a um desgaste telomérico acelerado, facilitando o surgimento de diversas doenças, como o câncer. O RNA longo não-codificante telomérico TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*), transcrito a partir da região subtelomérica dos cromossomos, parece estar relacionado à atividade da telomerase e à regulação do comprimento telomérico, e alterações em seus níveis de expressão já foram descritas em alguns tipos de cânceres. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão de TERRA em sangue periférico e medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com leucemias mieloides ou linfoides agudas (LMA e LLA, respectivamente) ou com telomeropatias (doenças que possuem em seu cerne alterações em genes relacionados à biologia dos telômeros). Também foram avaliados o comprimento telomérico, a expressão de *TERT* (um dos componentes da telomerase) e *TRF2* (uma das proteínas acessórias que ajudam a proteger o telômero), a atividade da telomerase e a formação de híbridos RNA-DNA (R-loops). As amostras de LMA (n=17) e telomeropatias (n=9) apresentaram telômeros bastante curtos quando comparados com indivíduos saudáveis ($p<0,0001$ e $p<0,001$, respectivamente). As amostras de LMA e LLA (n=5) apresentaram alta expressão de *TERT* ($p<0,001$), *TRF2* ($p<0,05$) e atividade de telomerase ($p<0,0001$), o que não foi observado nas amostras de telomeropatias. Além disso, as amostras de LMA mostraram alta transcrição de TERRA quando comparadas ao grupo saudável para as quatro regiões subteloméricas estudadas ($p<0,001$ para 20q, $p<0,0001$ para 10q, e $p<0,01$ para 15q e Xq/Yq), enquanto LLA e as telomeropatias mostraram uma expressão heterogênea, com níveis próximos aos do grupo saudável. Por fim, as amostras de LMA e LLA apresentaram aumento na formação de R-loops de TERRA ($p<0,0001$ e $p<0,001$, respectivamente) quando comparadas ao grupo saudável, o que foi observado em menor grau nas telomeropatias ($p>0,05$). Esta é a primeira descrição de expressão de TERRA em células hematopoéticas humanas primárias normais e neoplásicas. Nossos resultados indicam que o aumento da transcrição de TERRA é uma característica de blastos na leucemia mieloide aguda e não de células com telômeros curtos. A expressão de TERRA nas LMAs parece auxiliar na regulação positiva da expressão da telomerase (*TERT*) bem como de sua atividade que, juntamente com a formação de R-loops, podem auxiliar na manutenção dos seus telômeros mais curtos e prevenir a senescência.

Palavras-chave: Telômeros, TERRA, R-loops, leucemias, telomeropatias

ABSTRACT

ZANELATTO, L.C. **Expression of non-coding telomeric RNA (TERRA) in acute leukemias and telomeropathies.** 2019. 62pg. Thesis (Doctorate) - Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto- SP, 2019.

Telomeres are structures whose function is to protect the ends of the linear chromosomes and maintain genomic integrity. Constitutive mutations that interfere with telomere length maintenance mechanisms can lead to accelerated telomeric attrition, facilitating the emergence of various diseases, such as cancer. The telomeric repeat-containing RNA (TERRA), transcribed from the subtelomeric region of the chromosomes, may be related to telomerase activity and telomere length regulation, and changes in their expression levels have already been described in some types of cancers. This study aimed to investigate the expression of TERRA in peripheral blood and bone marrow of healthy individuals and patients with acute myeloid or lymphoid leukemias (AML or ALL), or telomeropathies (diseases that have in their core mutations in genes related to telomere biology). Also, the telomere length, the expression of *TERT* (one of the components of telomerase) and *TRF2* (one of the accessory proteins that help to protect the telomere), telomerase activity and formation of RNA-DNA (R-loops) hybrids were evaluated. The AML (n=17) and telomeropathy (n=9) samples had a significantly decreased telomere length when compared to healthy subjects ($p<0,0001$ and $p<0,001$, respectively). AML and ALL (n=5) samples had high expression of *TERT* ($p<0,001$), *TRF2* ($p<0,05$), and telomerase activity ($p<0,0001$), which was not observed in the telomeropathy samples. In addition, the AML samples displayed high TERRA transcription when compared to the healthy group for the four subtelomeric regions studied ($p<0,001$ for 20q, $p<0,0001$ for 10q, and $p<0,01$ for 15q and Xq/Yq), while ALL and telomeropathy samples displayed a heterogeneous expression, with levels close to those of the healthy group. Finally, AML and ALL samples showed an increase in TERRA R-loops formation ($p<0.0001$ and $p<0.001$, respectively) when compared to healthy individuals, which was not observed in telomeropathies ($p>0,05$). This is the first description of TERRA expression in normal and neoplastic human hematopoietic cells. Our results indicate that increased TERRA transcription is a characteristic of blasts in AML and not in cells with short telomeres. The expression of TERRA in the AMLs may contribute to the positive regulation of telomerase expression (*TERT*) as well as to its activity, which, together with the formation of TERRA R-loops, may help to maintain its shorter telomeres and prevent senescence.

Keywords: Telomeres, TERRA, R-loops, leukemias, telomeropathies

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura telomérica.....	09
Figura 2 – Esquema demonstrando o encurtamento telomérico durante as sucessivas divisões celulares (limite de Hayflick).....	10
Figura 3 – Representação da telomerase e seus constituintes (<i>TERT</i> e <i>TERC</i>).....	11
Figura 4 – Biogênese e regulação de TERRA em mamíferos.....	20
Figura 5 – Esquema mostrando a disposição e localização da sequência promotora (“61-29-37 repeats”) dentro da região subtelomérica.....	21
Figura 6 – O esquema mostra os grupos de indivíduos (separados por etiologia), número amostral, média de idade e os métodos utilizados para classificação.....	33
Figura 7 – Comprimento médio dos telômeros calculado através da razão relativa de T/S.....	36
Figura 8 – Expressão relativa de TERRA das regiões subteloméricas dos cromossomos 10q, 15q, 20q e Xq/Yq.....	38
Figura 9 – Expressão relativa de <i>TERT</i> (componente catalítico da telomerase).....	39
Figura 10 – Atividade relativa da telomerase (ART).....	40
Figura 11 – Expressão relativa de <i>TRF2</i> (componente do complexo telossomo).....	41
Figura 12 – Acúmulo de R-loops.....	43
Figura 13 – Detecção de R-loops por imunofluorescência.....	44
Figura 14 – Agrupamento hierárquico realizado no software MeV 4.9.0 utilizando-se todos os resultados obtidos no presente trabalho com o intuito de evidenciar a relação direta/inversa entre os parâmetros avaliados.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - <i>Primers</i> utilizados na avaliação do comprimento telomérico e expressão de TERRA.....	29
Tabela 02 - Distribuição etária e por gênero de indivíduos saudáveis (SP e MO).....	34
Tabela 03 - Distribuição etária, por gênero e características clínicas dos pacientes com LLA e LMA.....	34
Tabela 04 -Distribuição etária, por gênero e características clínicas dos pacientes com TEL.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	DNA complementar
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Disceratose congênita
DDR	DNA damage response
DIG	Digoxigenina
<i>DKC1</i>	<i>Dyskerin Pseudouridine Synthase 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
gDNA	DNA genômico
Hp1α	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
ID	Identificação
kb	Quilobase
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
min	Minutos
MO	Medula óssea
ND	Não-disponível
ng	Nanogramas
<i>ORC1</i>	<i>Origin recognition complex subunit 1</i>
p21	<i>CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	<i>Phosphoprotein / tumor protein 53</i>
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
<i>POT1</i>	<i>Protection of telomeres 1</i>

qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
<i>RAP1</i>	<i>Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
<i>RTEL1</i>	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>
s	Segundos
SMD	Síndrome mielodisplásica
SP	Sangue periférico
TEL	Telomeropatias
<i>TERC</i>	<i>Telomerase RNA component</i>
TERRA	<i>Telomeric repeat-containing RNA</i>
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
<i>TIN2/TINF2</i>	<i>TERF1-interacting nuclear factor 2</i>
<i>TPP1</i>	<i>Tripeptidyl Peptidase 1</i>
TRAP	<i>Telomere repeat amplification protocol</i>
<i>TRF1</i>	<i>Telomeric repeat-binding factor 1</i>
<i>TRF2</i>	<i>Telomeric repeat-binding factor 2</i>
UA	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
1.1. Telomeropatias	12
1.2. Distúrbios onco-hematológicos e biologia dos telômeros	16
1.3. TERRA (telomeric repeat-containing RNA)	18
1.4. TERRA e seu papel na regulação do comprimento telomérico	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Pacientes e indivíduos saudáveis (controles)	26
4.2. PCR quantitativa (qPCR) para a medição do comprimento telomérico	26
4.3. Extração de RNA e expressão de TERRA por RT-qPCR	27
4.4. Extração de RNA e expressão de <i>TERT</i> e <i>TRF2</i> por RT-qPCR	29
4.5. Avaliação da atividade da Telomerase	30
4.6. Imunofluorescência para detecção de R-loops	31
4.7. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Dados dos pacientes	33
5.2. Mensuração do comprimento telomérico	35
5.3. Expressão de TERRA por RT-qPCR	36
5.4. Expressão de <i>TERT</i> por RT-qPCR	38
5.5. Expressão de <i>TRF2</i> por RT-qPCR	40
5.6. Atividade da Telomerase (TRAP-ELISA ^{PLUS})	41
5.7. Análise do acúmulo de R-loops por Imunofluorescência	42
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	55
8. BIBLIOGRAFIA	56

1. Introdução

Desde meados da década de 1990, a biologia dos telômeros obteve grande interesse da comunidade científica sobre a importância destas estruturas para a estabilidade do genoma e proliferação celular (HARLEY et al., 1990; O’SULLIVAN & KARLSEDER, 2010; STEWART et al., 2012). Telômeros são estruturas nucleoproteicas localizadas na extremidade dos cromossomos lineares, formados por sequências de DNA repetidas *in tandem* e vinculados a um complexo de proteínas protetoras (denominado telossomo) (DE LANGE, 2009).

O complexo multiproteico telossomo (formado por TRF1, TRF2, TPP1, POT1, TIN2, e RAP1) funciona como um “escudo”, protegendo a extremidade dos cromossomos contra a perda de material genético durante a replicação e evitando que os telômeros sejam identificados como quebras de dupla-fita de DNA por exonucleases (DE LANGE, 2005; CALADO, 2009). Juntos, protegem o DNA e mantêm a integridade do genoma (CALADO & YOUNG, 2008; DE LANGE, 2009; YOUNG, 2012).

Em humanos, o DNA telomérico é composto de milhares de repetições de nucleotídeos hexaméricos 5’-TTAGGG-3’. Sua extremidade 3’ termina com uma saliência em forma de fita simples, capaz de invadir a dupla-hélice telomérica e formar uma estrutura em laço (T-loop), remodelando o DNA em um círculo (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura telomérica (adaptado de CALADO & YOUNG, 2008)

Apesar de todo este aparato protetor, a sequência telomérica na extremidade dos cromossomos encurta a cada divisão celular em razão da incapacidade da DNA polimerase de replicar completamente a extremidade das sequências de DNA da fita 3' (BLACKBURN, 2001; CALADO & DUMITRIU, 2013). Este problema de “replicação das extremidades” resulta em telômeros mais curtos a cada ciclo de replicação do DNA, e que podem atingir um comprimento criticamente curto. Por conseguinte, esses telômeros curtos podem induzir vias de sinalização na célula (como p53 e p21), desencadeando a parada do ciclo celular, senescência e/ou apoptose (EL BELBESY et al., 2015).

Este desgaste telomérico explica o “limite de Hayflick” (Figura 2), que corresponde ao número de mitoses que uma célula é capaz de sofrer *in vitro* (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). O comprimento de telômeros é, portanto, um “relógio mitótico”, uma medida da história proliferativa da célula (SHAY&WRIGHT, 2000). Em circunstâncias em que a proliferação celular continua apesar dos telômeros criticamente curtos, a sua função protetora é perdida. Como consequência, pode ocorrer a recombinação entre os cromossomos, levando à instabilidade cromossômica, aneuploidia e eventual transformação para um fenótipo maligno (CALADO & YOUNG, 2009).

Figura 2- Esquema demonstrando o encurtamento telomérico durante as sucessivas divisões celulares (limite de Hayflick) Adaptado de SHAY & WRIGHT, 2000.

No entanto, algumas células proliferativas possuem a capacidade de alongar os telômeros cataliticamente por meio da telomerase (Figura 3), um complexo ribonucleoproteico composto por uma enzima (transcriptase reversa, codificada pelo gene *TERT*), uma molécula-molde de RNA (codificada por *TERC*) e proteínas acessórias (como a discerina por exemplo, codificada pelo gene *DKC1*) (ZHANG; KIM; FEIGON, 2011). Tal grupamento enzimático adiciona hexâmeros nucleotídicos à extremidade 3' dos telômeros, o que garante a manutenção do seu comprimento. Desta forma, a telomerase contrabalança os efeitos da divisão e do "envelhecimento" celular, prevenindo a senescência, apoptose e instabilidade genética (YOUNG, 2012).

Figura 3- Representação da telomerase e seus constituintes (*TERT* e *TERC*). Adaptado de ZHANG; KIM; FEIGON, 2011.

A atividade da telomerase é cuidadosamente regulada em todos os tecidos e tipicamente expressa apenas durante a embriogênese. A partir do período neonatal, a atividade da mesma é largamente reprimida, exceto em certos órgãos altamente proliferativos, como a pele, intestino e medula óssea, que mantêm subpopulações de células-tronco. Este complexo enzimático também é superexpresso na maioria das células cancerosas, o que reflete a necessidade de manutenção do comprimento telomérico para o potencial proliferativo (PAIVA & CALADO, 2014).

O desgaste acelerado dos telômeros pode ter origem genética (mutações), ser um resultado fisiológico do estresse regenerativo (como em células altamente proliferativas) ou secundário a danos no DNA. Mutações constitutivas na telomerase que reduzem a capacidade de alongamento dos telômeros podem tornar o seu reparo defeituoso e, conseqüentemente, causar um acelerado desgaste telomérico, facilitando o surgimento de diversas doenças, como câncer (leucemias e outros tumores sólidos) e outros distúrbios da homeostase telomérica, conhecidas como telomeropatias (WINKLER et al., 2013).

1.1. Telomeropatias

O distúrbio da homeostase telomérica está presente em diversas doenças humanas. Telomeropatias são um conjunto de doenças complexas relacionadas à biologia aberrante dos telômeros. Estas incluem um amplo espectro de manifestações clínicas em crianças e adultos, dos quais a falência da medula óssea é a mais reconhecida (CALADO & YOUNG, 2009; OPRESKO & SHAY, 2017). Elas podem variar de doenças clinicamente muito graves com envolvimento de vários órgãos e surgimento na infância (como na disceratose congênita, “DC”) para doenças com um único órgão afetado, como na fibrose pulmonar ou cirrose hepática (CALADO & DUMITRIU, 2013).

Deste modo, as telomeropatias devem ser consideradas como um espectro de distúrbios relacionados, unidos por um mecanismo molecular em comum, acometendo órgãos distintos. Por exemplo, uma criança com a tríade mucocutânea clássica da DC (distrofia ungueal, hiper/hipopigmentação da pele e leucoplasia) e falência medular pode não parecer clinicamente semelhante a um adulto de meia-idade com fibrose pulmonar, mas eles podem ter uma mutação germinativa no mesmo gene, e ambos podem ter um risco elevado de câncer (TOWNSLEY et al., 2014).

Mutações em diferentes genes responsáveis pelo funcionamento e manutenção dos telômeros podem levar ao surgimento de telomeropatias. A DC foi a primeira desordem identificada com uma ligação clara à manutenção prejudicada dos telômeros (MITCHELL; WOOD; COLLINS, 1999). O defeito herdado na DC ligada ao cromossomo X deve-se a mutações no gene *DKC1* (YOUNG, 2012). Este gene codifica a discerina, uma proteína que se liga ao componente de RNA da telomerase e estabiliza o complexo. Desta forma, pelo fato de os pacientes (do sexo masculino) serem hemizigotos para a mutação, a atividade da telomerase nas células desses indivíduos é muito baixa, embora não totalmente

ausente (BARTHEL et al., 2017). Além disso, mutações no gene *TERC*, que codifica o componente de RNA do complexo da telomerase, foram identificadas na forma autossômica dominante da DC.

Na idade adulta, a fibrose pulmonar idiopática (FPI) é a manifestação clínica mais comum de uma telomeropatia. A FPI é uma doença pulmonar intersticial fibrosante crônica, de etiologia desconhecida e que pode ter cunho familiar ou esporádico (WOLTERS; COLLARD; JONES, 2014). Nesta doença, estimativas de vários grupos independentes revelaram variantes genéticas raras em oito genes que podem estar ligados à FPI, incluindo cinco genes ligados à função dos telômeros (*TERT*, *TERC*, *RTEL1*, *DKC1* e *TINF2*) (TSAKIRI et al., 2007; HISATA et al., 2013; KANNENGIESSER; BORIE; REVY, 2014; COGAN et al., 2015). Em conjunto, aproximadamente um quinto das fibroses pulmonares familiares são atribuídas a tais mutações (KROPSKI; BLACKWELL; LOYD, 2015). De maneira semelhante, mutações em *TERT*, *TERC* e *RTEL1* foram identificadas em indivíduos com FPI esporádica (embora em menor grau) e os telômeros curtos encontrados no sangue periférico e nas células do epitélio alveolar são um fator de risco para seu desenvolvimento (ARMANIOS, 2012).

A anemia aplástica é uma doença hematológica caracterizada pela hipocelularidade da medula óssea em que as células hematopoéticas vão sendo substituídas por tecido adiposo. A doença pode ser adquirida ou constitucional (YOUNG, 2002), sendo que, na maioria dos casos adquiridos, o tecido hematopoético é alvo de um processo autoimune que causa morte celular por apoptose (RISITANO et al., 2004). Nestes casos, a doença pode ser tratada por meio de transplante alogênico de medula óssea ou terapia imunossupressora. Diversos grupos de pesquisa observaram telômeros curtos em leucócitos de aproximadamente um terço dos pacientes com anemia aplástica adquirida, especialmente aqueles que não respondiam à terapia imunossupressora (BRUMMENDORF, 2001). Além

disso, cerca de 10% dos pacientes com anemia aplástica adquirida aparente possuem mutações em *TERC* ou *TERT* (YAMAGUCHI et al., 2005; WINKLER et al., 2013; RINELLI et al., 2018).

O fígado também é afetado nas doenças do telômero. Cirrose hepática, hipertensão portal não-cirrótica e síndrome hepatopulmonar foram relatadas como complicações associadas às desordens teloméricas (BERTUCH & GRAMATGES, 2013). Estas complicações levaram a um estudo realizado por Calado et al. (2009) de cinco famílias com doença hepática combinada com distúrbios autoimunes e hematológicos. Concluiu-se que mutações com perda de função de *TERC* ou *TERT* estavam associadas a tais fenótipos clínicos.

De maneira geral, as mutações mais predominantes em telomeropatias são na transcriptase reversa (*TERT*) ou no componente de RNA da telomerase (*TERC*) (SHAY, 2018). Entretanto, a prevalência de genes mutados varia com a apresentação clínica. Nos casos de variantes em *TERT* e *TERC*, as mutações são, na grande maioria dos casos, em heterozigose, ou seja, os pacientes mantêm um alelo do tipo selvagem e a atividade da telomerase é de aproximadamente 50% do observado em indivíduos saudáveis, além de um quadro clínico mais tardio. Logo, a deficiência de telomerase ocorre por haploinsuficiência e estes pacientes possuem telômeros curtos (CALADO & DUMITRIU, 2013; SAVAGE, 2014). As manifestações da doença podem ser mais intensas nas mutações em *TERC* quando comparadas com mutações em *TERT*, devido aos efeitos mais profundos na atividade da telomerase (VULLIAMY et al., 2011; TOWNSLEY et al., 2014).

Como a função da telomerase é parcialmente deficiente nas mutações em heterozigose em *TERT* e *TERC*, a penetrância destas mutações torna-se variável, agindo mais como fatores de risco do que como determinantes das doenças; indivíduos podem carregar uma mutação na telomerase mas não desenvolver a doença, e os pacientes herdam tanto a

mutação quanto os telômeros curtos do familiar afetado. Dado este padrão de herança complexa, os telômeros tornam-se mais curtos a cada geração, e a doença pode se manifestar mais cedo ou mais intensamente na prole, um fenômeno chamado "antecipação da doença" (VULLIAMY et al., 2004; CALADO & DUMITRIU, 2013).

Em adição aos genes acima mencionados, mutações em outros genes que codificam proteínas que não fazem parte do complexo holoenzimático da telomerase também impactam no comprimento dos telômeros (SAVAGE, 2014). *TINF2* codifica a proteína TIN2, uma componente chave do complexo proteico telossomo, responsável pela proteção dos telômeros (WALNE et al., 2013). Essa proteína está relacionada ao recrutamento da telomerase até os telômeros, além de auxiliar na coesão telomérica (FRANK et al., 2015). Logo, pacientes com mutações em *TINF2* apresentam defeitos no recrutamento e na coesão dos telômeros, e alongamento mediado pela telomerase prejudicado, resultando em extremo encurtamento telomérico (HOUGHTALING et al., 2012).

As mutações associadas a esse gene são autossômicas dominantes e compõem uma parte substancial dos casos de DC, entre 10 a 30% (WALNE et al., 2008; PAIVA & CALADO, 2014). Em contraste com os indivíduos portadores de mutações heterozigotas em *TERT* ou *TERC*, mutações em *TINF2* são mais frequentes na “primeira infância”, como foi demonstrado em casos onde o status da mutação dos familiares do indivíduo afetado é conhecido (DU et al., 2009; EL BELBESY et al., 2015). Crianças com mutação deletéria em *TINF2* geralmente apresentam falência medular antes do desenvolvimento das características mucocutâneas da DC. Assim, a ausência de história familiar e/ou de características mucocutâneas não exclui a presença desta mutação (SASA et al., 2012; OPRESKO & SHAY, 2017).

1.2. Biologia dos telômeros em doenças onco-hematológicas

Em contraste à maioria das células somáticas que não possuem telomerase ativa, células-tronco e progenitoras hematopoéticas, assim como linfócitos ativados, expressam alguma atividade de telomerase (BROCCOLI et al., 1995; COUNTER et al., 1995). No entanto, a presença de telomerase não implica necessariamente em um comprimento telomérico estável e, portanto, imutável. De fato, os telômeros das células do sangue periférico e da medula óssea encurtam durante o envelhecimento replicativo natural (OHYASHIKI et al., 2002). Esta perda gradual dos telômeros com o envelhecimento celular, aliada à ciclagem rápida das células-tronco hematopoéticas e linfócitos, pode gerar instabilidade genômica decorrente do encurtamento telomérico, acúmulo de mutações e falha no mecanismo de resposta a danos no DNA, contribuindo para a seleção de células anormais e progressão maligna (surgimento de neoplasias) (BARTHEL et al., 2017).

Perturbações da homeostase telomérica têm sido implicadas na patogênese de diferentes neoplasias hematológicas, como síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA) (CALADO et al., 2009a). O comprimento telomérico das células neoplásicas parece ser significativamente reduzido em pacientes com neoplasias mieloides quando comparado a controles pareados por idade. Este encurtamento telomérico pode resultar do aumento da replicação necessária para a progressão da doença ou de mecanismos regulatórios alterados dos telômeros. O atrito dos telômeros em células hematopoéticas pode levar à instabilidade genômica e anormalidades citogenéticas, como ganho ou perda de cromossomos e translocações. Essa instabilidade genômica desempenha um papel importante no início da leucemia, conforme indicado pelo desenvolvimento de LMA após a exposição à quimioterapia citotóxica ou à radiação ionizante, ou dos 40% a 50% dos pacientes com LMA que apresentam citogenética anormal

(AALBERS et al., 2013; EL BELBESY et al., 2015).

Os telômeros são significativamente mais curtos nas células leucêmicas com citogenética anormal quando comparados àquelas sem anormalidade, sendo que os pacientes com cariótipos com múltiplas aberrações têm os telômeros mais curtos (CAPRARO et al., 2011). Além da citogenética, comprimento telomérico encurtado e aumento da atividade da telomerase também se correlacionam com a progressão da doença e recaída (WANG et al., 2014).

Mutações constitucionais de perda de função nos genes do complexo da telomerase foram implicadas como fatores de risco para LMA em adultos. Além disso, mutações germinativas hipofuncionais em *TERT* também foram identificadas em pacientes com LMA citogeneticamente anormais (CALADO et al., 2009a).

Na LMA pediátrica, variantes nos genes do complexo da telomerase *TERT* e *TERC* não parecem ser um fator de risco para o seu desenvolvimento. Clinicamente, mutações de perda de função em *TERC* ou *TERT* podem aumentar o risco de toxicidade relacionada à quimioterapia e são relevantes na seleção de doadores (irmãos) para o transplante de células-tronco hematopoéticas (VASKO et al., 2017).

Os níveis de telomerase na LMA também podem estar elevados por mutações no promotor de *TERT* ou por amplificação do mesmo gene, ou mesmo superexpressão de genes que aumentam a atividade da telomerase (CHIBA et al., 2017). Em um estudo feito por El Belbesy et al. (2015), o nível sérico de *TERT* foi significativamente maior nos pacientes com LMA comparado ao grupo controle. Isso é consistente com estudos anteriores que relataram aumento do nível sérico de *TERT* em vários tumores sólidos, como câncer de pulmão (SNIJDERS et al., 2004), câncer colorretal (TERRIN et al., 2008), carcinoma de mama (SALHAB et al., 2008), carcinoma hepatocelular (EL-MAZNY; SAYED; SHARAF, 2014) e neoplasia hematológica (HARTMANN et al., 2005).

Na LMA e LLA, a atividade da telomerase correlaciona-se com a expressão de *TERT*, e é maior no momento do diagnóstico ou progressão do que no momento da remissão (CAPRARO et al., 2011). Embora a atividade da telomerase se correlacione com a expressão de *TERT* na LMA e na LLA, não há correlação significativa entre estes fatores e o comprimento dos telômeros. Ao contrário, quanto mais curtos os telômeros nos conjuntos de amostras, maiores suas atividades da telomerase e expressão de *TERT* (WATTS et al., 2016).

1.3. TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*)

Durante muitos anos teve-se como correta a hipótese de que as extremidades dos cromossomos, por estarem localizadas em uma região heterocromática e por possuírem uma baixa densidade gênica, fossem *loci* genômicos transcricionalmente inativos; entretanto, em 2007, Azzalin et al. demonstraram que os telômeros de mamíferos são, de fato, transcritos em longos RNAs não-codificantes, denominados TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*) (AZZALIN et al., 2007; WANG et al., 2015). Moléculas TERRA foram detectadas em uma variedade de organismos, incluindo levedura, peixe-zebra, rato e humano, e evidências mostram que participam ativamente dos mecanismos que regulam a homeostase e função dos telômeros (SCHOEFTNER & BLASCO, 2010; CUSANELLI & CHARTRAND, 2015).

TERRAs são transcritos pela RNA polimerase II, a partir de vários *loci* na região subtelomérica em direção às extremidades dos cromossomos, consistindo de sequências de RNA subtelomérico seguidas por repetições *in tandem* 5'-UUAGGG-3' (em vertebrados), com tamanhos que variam entre 200 pares de base (pb) até >10 quilobases (kb) em mamíferos (AZZALIN et al., 2007; AZZALIN & LINGNER, 2015; WANG et al., 2015). Em humanos, a grande maioria dessas repetições UUAGGG das moléculas TERRA possui um comprimento aproximado de 200 bases, enquanto a maior parte da sequência de TERRA

corresponde à região subtelomérica, sendo sua heterogeneidade em grande parte devida a diferentes comprimentos desta parte do RNA (FEUERHAHN et al., 2010; MONTERO et al., 2016).

Todas as moléculas TERRA humanas contêm um “*cap*” de 7-metilguanosina (m^7G) em sua extremidade 5’ (Figura 4a). Isto indica que as extremidades 5’ de TERRA são definidas pela iniciação da transcrição, e não devido a eventos de processamento pós-transcricionais (PORRO et al., 2010).

TERRA é expresso na maioria dos tecidos de mamíferos (SCHOEFTNER; BLASCO, 2008). Apenas cerca de 7 a 10% das moléculas TERRA humanas possuem um cauda poli(A), ao passo que a maior parte das moléculas de levedura são poliadeniladas (AZZALIN & LINGNER, 2015). Ainda não se sabe o motivo dessa diferença nas moléculas de TERRA (poliadenilada ou não-poliadenilada), porém a maioria das moléculas TERRA poli(A)⁻ permanecem associadas aos telômeros e parecem ter um papel na manutenção de sua estrutura e facilitar sua replicação, enquanto que as moléculas TERRA poli(A)⁺ ficam livres no nucleoplasma e não possuem função definida (Figura 4) (LUKE & LINGNER, 2009; FEUERHAHN et al., 2010).

Figura 4- Biogênese e regulação de TERRA em mamíferos. (A) A transcrição de TERRA começa na região subtelomérica (a partir da região promotora, formada por ilhas CpG em alguns cromossomos) e procede em direção à extremidade 3' dos cromossomos. (B) Localização de TERRA: poli(A)⁺ TERRA é presente no nucleoplasma, enquanto aproximadamente 50% de poli(A)⁻ TERRA permanece ligado à cromatina, associado aos telômeros (adaptado de FEUERHAHN et al., 2010).

Alterações nos componentes do telossomo parecem também afetar os níveis de TERRA. A superexpressão de *TRF2* em células de camundongo resulta em encurtamento telomérico acompanhado por espaçamento nucleossomal aumentado. Apesar desta estrutura aberta da cromatina, uma diminuição nos níveis de TERRA é observada (BENETTI et al., 2008; OSTERWALD et al., 2015). Por outro lado, a depleção de *TRF2* leva a um aumento na transcrição de TERRA em um modo p53-dependente. Embora estes resultados pareçam apontar *TRF2* como um regulador negativo de TERRA, deve-se observar que a depleção de

TRF2 leva ao acúmulo de danos ao DNA nos telômeros, levantando a possibilidade de que a regulação positiva de TERRA possa ser parte de uma resposta celular fisiológica aos eventos de danos ao DNA telômero-específicos (HUDA et al., 2012; LEE et al., 2018).

Outra característica de TERRA está no controle de sua transcrição. Em humanos, dentro da região subtelomérica de pelo menos 20 cromossomos (dos 23 pares que possuímos) existem sequências que partilham uma região conservada, contendo três diferentes intervalos de DNA repetitivos. O primeiro, mais próximo à região centromérica, contém repetições *in tandem* de 61 pb. O segundo, um pouco mais distal, compreende repetições *in tandem* de 29 pb, seguido pelo terceiro, que possui repetições *in tandem* de 37 pb. A esta região convencionou-se o nome de “61-29-37 repeats” (Figura 5) (NERGADZE et al., 2009; MONTERO et al., 2016).

Figura 5- Esquema mostrando a disposição e localização da sequência promotora (“61-29-37 repeats”) dentro da região subtelomérica (adaptado de NERGADZE et al., 2009).

O teor global elevado (67% - 86%) de dinucleotídeos CpG típicos de ilhas CpG encontrados nessas repetições sugere que elas possam agir como regiões promotoras que controlam a transcrição de TERRA nestes cromossomos (NERGADZE et al., 2009; ROAKE & ARTANDI, 2017).

Essas descobertas definem os telômeros humanos como componentes de “unidades gênicas integrais”, apoiando a ideia de que TERRA possa exercer funções importantes na biologia dos telômeros (CHU et al., 2017).

1.4. TERRA e seu papel na regulação do comprimento telomérico

TERRA parece desempenhar importantes funções e participar ativamente dos mecanismos que regulam a homeostase e função dos telômeros (SCHOEFTNER & BLASCO, 2010; CUSANELLI & CHARTRAND, 2015) e os achados são antagônicos. Por um lado, TERRA parece promover o encurtamento telomérico ao regular negativamente a atividade da telomerase *in vitro*. As extremidades 3' de TERRA (UUAGGG) são complementares ao molde de RNA (*TERC*) da telomerase, e estudos em células de mamíferos mostraram a interação entre esses componentes, sugerindo que TERRA possa inibir a atividade da telomerase (AZZALIN & LINGNER, 2015). Além disso, células que possuem a telomerase ativa exibem graus de metilação maiores na região promotora de TERRA e níveis menores de TERRA quando comparadas com células telomerase-negativas (KREILMEIER et al., 2016). Outrossim, evidências indicam que TERRA seja capaz de formar híbridos RNA-DNA com os telômeros (R-loops), o que poderia favorecer a recombinação homóloga entre os mesmos, atrasando a senescência celular e sustentando a instabilidade genômica (AGUILERA & CIMPRICH, 2015; WAHBA et al., 2016).

Em oposição a esses achados, outros estudos sugerem que TERRA também possa promover o alongamento telomérico. Um estudo recente em leveduras sugeriu que o encurtamento dos telômeros desencadeia a expressão de TERRA, que se acumula em um foco na periferia nuclear. Este foco favorece o recrutamento da telomerase, formando aglomerados de TERRA-telomerase, que posteriormente se associam aos telômeros curtos que originaram as moléculas de TERRA (ou seja, atuam *in cis*) (CUSANELLI et al., 2013). Desta forma, o encurtamento do telômero parece induzir a expressão de TERRA, que funciona como identificador único da extremidade cromossômica em que foi transcrito e contribui para o recrutamento e a atividade da telomerase em telômeros mais curtos, promovendo seu

alongamento (SMEKALOVA & BAUMANN, 2013; KREILMEIER et al., 2016).

Como discutido anteriormente, a expressão de TERRA é regulada pelo estado heterocromático dos telômeros. Entretanto, evidências também apontam um papel para TERRA no estabelecimento da heterocromatina telomérica (CUSANELLI & CHARTRAND, 2014). Um potencial mecanismo proposto pelo qual TERRA pode auxiliar na formação de heterocromatina é de que ele atue como uma ponte entre TRF2 e ORC1 e estabilize a interação entre as duas proteínas, facilitando o recrutamento de fatores, tais como HP1 α , nos telômeros. HP1 α promove a trimetilação da lisina 9 na histona telomérica H3 (H3K9me3), contribuindo para a formação da heterocromatina (GREENWOOD & COOPER, 2012).

Em suma, TERRA parece possuir uma função importante na biologia dos telômeros e na regulação do comprimento telomérico, e seu perfil alterado pode levar ao surgimento ou influenciar no prognóstico de determinadas doenças, merecendo especial atenção.

2. Justificativa

TERRA possui função importante na biologia dos telômeros, atuando na formação da heterocromatina, no controle da atividade da telomerase e na regulação do comprimento telomérico. Alterações nos níveis de expressão de TERRA já foram descritas em alguns tipos de cânceres e na síndrome ICF (do inglês *Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome*).

A influência de TERRA na promoção do encurtamento telomérico leva à hipótese de que esse RNA possa exercer papel importante nas telomeropatias e em neoplasias hematológicas (YEHEZKEL et al., 2008, 2013; SAMPL et al., 2012; SAGIE et al., 2017), porém, tal relação ainda não foi explorada. Desta forma, faz-se necessário um estudo para avaliar se TERRA é influenciado ou influencia, de alguma maneira, na etiologia das telomeropatias e neoplasias hematológicas.

3. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo investigar os perfis de expressão de TERRA em telomeropatias e leucemias agudas, e os agentes moduladores e mecanismos que pudessem estar envolvidos nesse processo.

Como pontos específicos desta pesquisa, destacam-se:

- Coletar amostras de sangue periférico e/ou medula óssea de indivíduos saudáveis e de pacientes com telomeropatias ou leucemias agudas (LMA e LLA);
- Medir o comprimento dos telômeros desses indivíduos saudáveis e pacientes;
- Avaliar os níveis de expressão de TERRA;
- Mensurar a atividade da telomerase;
- Avaliar os níveis de expressão de *TERT* e *TRF2*;
- Averiguar a presença de híbridos RNA-DNA (R-loops);
- Investigar a possível relação entre TERRA e a dinâmica telomérica observada nessas patologias.

4. Material e métodos

4.1. Pacientes e indivíduos saudáveis (controles)

Participaram do estudo indivíduos diagnosticados com neoplasias hematológicas (LMA, n=17 e LLA, n=5) ou telomeropatias (n=9), bem como indivíduos saudáveis (controles, n=18). Os pacientes foram acompanhados pelo serviço de hematologia do Hospital das Clínicas (HC- USP Ribeirão Preto). Os pacientes com telomeropatias apresentavam telômeros curtos (abaixo do percentil 10%) ou muito curtos (abaixo do percentil 1%) para a idade e/ou mutações em genes da biologia dos telômeros (*TERT*, *TERC*, *DKC1* e *TINF2*), as quais foram previamente identificados em nosso laboratório. Os indivíduos considerados saudáveis (controles) foram aqueles sem alterações nas contagens hematológicas no sangue periférico e sem histórico de neoplasias hematológicas ou telomeropatias em suas famílias. Os pacientes e indivíduos saudáveis elegíveis foram convidados a participar do estudo após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) (CAAE: 56533316.1.0000.5440, anexo 01), mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Amostras de sangue periférico e/ou medula óssea foram coletadas, para posterior extração de DNA, RNA e proteínas.

4.2. PCR quantitativa (qPCR) para a medição do comprimento telomérico

A qPCR foi executada conforme descrito por CAWTHON (2002; 2009) com modificações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa e descritas por GUTIERREZ-RODRIGUES et al. (2014). Resumidamente, o DNA genômico (gDNA) foi extraído do “buffy coat” de amostras de sangue ou medula óssea pelo kit Gentra Puregene Blood (Qiagen). O DNA foi quantificado por análise no aparelho Denovix e sua integridade

verificada em gel de agarose (1%). As reações de PCR foram realizadas em triplicatas, consistindo-se do fluorocromo SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 10 μ M oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 01) e 1,6 ng de DNA por reação. As curvas padrão foram geradas utilizando 6 diluições em série (1:2) de gDNA (partindo-se de 10 ng). Realizou-se a amplificação e quantificação no Rotor-Gene Q (Qiagen) em duas etapas: primeiro, utilizando iniciadores para repetições teloméricas (T) e em seguida, utilizando iniciadores para um gene de cópia única no genoma, o *36B4* (S).

As condições da qPCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 5 min, e 25 ciclos a 98°C por 7 s, 60°C por 10 s (para “T”) e 95°C por 5 min seguidos de 35 ciclos a 98°C por 7 s, 58°C por 10 s (para “S”).

O comprimento médio dos telômeros para cada amostra foi calculado como a razão relativa de T/S. O resultado final para uma dada amostra representa a mediana de pelo menos dois ensaios independentes.

4.3. Extração de RNA e expressão de TERRA por RT-qPCR

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol LS (Ambion), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, quantificou-se o RNA por análise no Denovix e sua integridade foi verificada em gel de agarose (0,8%). As amostras de RNA foram tratadas com RNase-Free DNase Set (Qiagen) e purificadas com o kit RNA clean & concentrator (Zymo Research) por duas vezes, para evitar o menor resquício de contaminação com DNA na amostra, pois o mesmo interfere de maneira significativa na reação. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μ g de RNA através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher), utilizando oligonucleotídeos específicos para o TERRA (10 μ M), assim como um controle (β -actina, 1 μ M, Tabela 01).

As reações de amplificação e quantificação da expressão de TERRA foram realizadas no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram estudadas 4 regiões cromossômicas subteloméricas (10q, 15q, 20q e Xq/Yq) utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos a 10 μ M (Tabela 01) para cada região. Essas regiões foram escolhidas pelo fato de serem as mais comumente utilizadas nos estudos de TERRA (PORRO et al., 2010, 2014a; ARNOULT; VAN BENEDEN; DECOTTIGNIES, 2012) e por possuírem grau elevado de “ilhas CpG” em suas regiões promotoras. Curvas padrão foram geradas utilizando 9 diluições em série (1:2) de gDNA (a partir de 10 ng). Como controles positivo e negativo para a expressão de TERRA, utilizou-se duas linhagens celulares, VA-13 e HeLa. Estudos anteriores demonstraram que VA-13 possui expressão de TERRA aumentada e ausência de atividade da telomerase, mantendo o comprimento telomérico por mecanismos alternativos (ALT, do inglês “alternative lengthening of telomeres”) (ARORA et al., 2014a), enquanto que HeLa apresenta uma menor expressão de TERRA e atividade da telomerase aumentada.

As condições da qPCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. A expressão relativa de TERRA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2002) e normalizada pela expressão do gene de referência (β -actina) na mesma amostra. A expressão de TERRA em cada amostra é apresentada como sendo relativa à expressão no controle positivo, VA-13. Todas as reações foram realizadas em triplicata, com pelo menos dois ensaios biológicos independentes.

Tabela 01- Primers utilizados na avaliação do comprimento telomérico e expressão de TERRA

Nome	Sequência 5'- 3'
<i>hTERRA RT</i>	5'- (CCC TAA) ₅ – 3'
<i>hβ-actin RT</i>	5'- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG- 3'
<i>hChr 20q</i>	F- GAA GTT GCT GGG TTC TAT GG R- ATG GTG CAG ACA CTG TGG
<i>hChr 15q</i>	F- CAG CGA GAT TCT CCC AAG CTA AG R- AAC CCT AAC CAC ATG AGC AAC G
<i>hChr 10q</i>	F- TCA AGG TCA GAG ACC AGT TAG AAC G R- TGC TGC ATT TGA GTT CCG ACG
<i>hChr Xq/Yq</i>	F- GGA AAG CAA AAG CCC CTC TGA ATG R- ACC CTC ACC CTC ACC CTA AG
<i>hβ-actin</i>	F- TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA R- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<i>Compr telomérico (T)</i>	F- CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT R- GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT
<i>36B4 (S)</i>	F- CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC R- CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A

Primers (T) e (S) foram utilizados para análise do comprimento telomérico, enquanto os demais para avaliar a expressão de TERRA. F: forward; R: reverse.

4.4. Extração de RNA e expressão de *TERT* e *TRF2* por RT-qPCR

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol LS (Ambion), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, o RNA foi quantificado por análise no Denovix e sua integridade verificada em gel de agarose (0,8%). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher), utilizando 10 µM oligonucleotídeos randômicos do próprio kit.

As reações de qPCR para a quantificação da expressão de *TERT* e *TRF2* foram realizadas em triplicatas no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando cDNA (diluído 1:4), TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e sondas TaqMan específicas para cada gene (Hs99999022_m1 para *TERT* e Hs00194619_m1 para *TRF2*, Applied Biosystems).

As condições da qPCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. Todas as reações foram

realizadas em triplicata, com pelo menos dois ensaios biológicos independentes. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2002), normalizada pela expressão do gene de referência (β -actina, Hs00357333_g1, Applied Biosystems) em cada amostra.

4.5. Avaliação da atividade da telomerase

Avaliou-se a atividade da telomerase *in vitro* utilizando o kit TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram extraídas a partir dos *pellets* celulares com tampão de lise CHAPS. Após a extração, as mesmas foram quantificadas pelo kit PierceTM BCA protein assay (Thermo Scientific), com sua leitura sendo realizada por espectrofotometria de fluorescência no aparelho VersaMax[®] M3.

No primeiro passo, a telomerase (presente no *pool* de proteínas extraídas com o CHAPS) adiciona repetições teloméricas (TTAGGG) ao fim 3' do primer sintético P1-TS marcado com biotina. Esses produtos de alongamento, bem como um Padrão Interno (IS) (DNA, 0,001 amol/ μ L, incluído no kit) presentes no mesmo tubo de reação, foram posteriormente amplificados por PCR usando os *primers* P1-TS e o *primer*-ancorador P2. Os produtos de PCR (derivados dos produtos de alongamento mediado pela telomerase no primeiro passo) contêm as adições de 6 nucleotídeos telomerase-específicos, enquanto o Padrão Interno (IS) gera um produto de PCR de 216 pb.

Os produtos de PCR foram divididos em duas alíquotas, desnaturados e hibridizados separadamente com sondas marcadas com digoxigenina (DIG), específicas para as repetições teloméricas (P3-T) ou para o Padrão Interno (IS) (P3-Std), respectivamente. Posteriormente, os produtos resultantes foram imobilizados (através da biotina) a uma microplaca revestida com estreptavidina e os *amplicons* foram detectados por ELISA, com um anticorpo anti-digoxigenina conjugado com peroxidase (Anti-DIG-HRP). Cada reação foi

efetuada em duplicata e normalizada para a atividade de uma quantidade equivalente de um controle padrão (DNA, 0,1 amol/uL, contido no kit).

4.6. Imunofluorescência para detecção de *R-loops*

Realizou-se a imunofluorescência das células dos pacientes em lâmina, com o intuito de verificar a presença de híbridos DNA-RNA (R-loops). Para tal estudo, foram selecionados dois indivíduos saudáveis, um paciente com LLA, dois pacientes com LMA e um paciente com telomeropatia, bem como as linhagens VA-13 e HeLa. Além disso, foram feitas marcações com VA-13 sem o anticorpo primário (S9.6), para mostrar a especificidade da marcação do anticorpo secundário (Alexa Fluor 488), e também VA-13 tratada com RNase H, pois esta é capaz de degradar os R-loops.

As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% (Sigma-Aldrich, 15 min, no gelo), aderidas às lâminas através da citocentrífuga CytoSpin 3 (Thermo-Shandon, 1000 rpm, 2 min), coradas com DAPI (10 µL, 10 min, Sigma-Aldrich), lavadas três vezes com 1× PBS (5min cada lavagem), tratadas com glicina 0,1 M (30 min, para anular uma possível autofluorescência do PFA), permeabilizadas e bloqueadas com solução de bloqueio (0,3% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) + 1% BSA/PBS, 40 min).

Em seguida, incubou-se o anticorpo primário S9.6 (anticorpo que detecta híbridos RNA-DNA, não necessariamente específicos de TERRA) (Kerafast, *mouse*, 1:1000, *anti-hybrid*, diluído em solução de bloqueio) *overnight*. Após, as lâminas foram lavadas três vezes com 1× PBS (5 min cada lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário por 45 min (Alexa Fluor 488, 1:1000 em 1x PBS, *rabbit anti-mouse* (ThermoFisher). Por fim, as lâminas foram lavadas cinco vezes por 5 min com 1× PBS, e uma vez por 5 min com H₂O milli-Q, montadas com Fluoromont G (Eletron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) e vedadas com base cosmética sem formaldeído.

As imagens das lâminas foram capturadas no aparelho Zeiss LSM 780 em um microscópio invertido AxioObserver (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), com objetiva em aumento de 63× em imersão a óleo, NA 1.4. A intensidade média de fluorescência por núcleo foi determinada usando o *software* Fiji (ImageJ 1.x) (SCHINDELIN et al., 2012). Foram analisadas ao menos 100 células para cada paciente ou controle.

4.7. Análise estatística

O Software Prism 5.1 (GraphPad) foi utilizado na análise estatística e criação dos gráficos. Os níveis de expressão relativa de TERRA, *TERT* e *TRF2* foram determinados pelo método de Pfaffl (2002) (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), com a estatística realizada através do ensaio de Kruskal-Wallis, seguida do teste post-hoc de Dunn. De maneira semelhante, as taxas de comprimento telomérico, a atividade da telomerase e a intensidade de sinal de S9.6 (detecção de R-loops) tiveram suas análises estatísticas determinadas pelo ensaio de Kruskal-Wallis, seguida do teste post-hoc de Dunn. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1. Dados dos pacientes

Dados relacionados aos grupos de indivíduos, como sexo, número amostral, média de idade, número de blastos (ao diagnóstico), citogenética, mutações encontradas pelo sequenciamento para as telomeropatias e os métodos utilizados para o diagnóstico, estão listados na Figura 6 e nas Tabelas 2, 3 e 4.

Figura 6- O esquema mostra os grupos de indivíduos (separados por etiologia), número amostral, média de idade e os métodos utilizados para classificação. SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias.

Tabela 02- Distribuição etária e por gênero de indivíduos saudáveis (SP e MO).

	ID	Sexo	Idade
Saudáveis (SP e MO)	SP1	M	28
	SP2	F	25
	SP3	F	41
	SP4	F	71
	SP5	F	62
	SP6	M	33
	SP7	F	26
	SP8	F	27
	SP9	M	26
	SP10	F	58
	SP11	F	56
	SP12	F	28
	SP13	F	31
	SP14	F	26
	MO1	F	75
	MO2	F	28
	MO3	M	38
	MO4	M	54

ID: identificação; SP: sangue periférico; MO: medula óssea; M: masculino; F: feminino; idade em anos.

Tabela 03- Distribuição etária, por gênero e características clínicas dos pacientes com LLA e LMA.

	ID	Sexo	Idade	Citogenética	Nº de blastos
LLA	LLA1 _(M)	M	20	ND	96%
	LLA2 _(M)	M	12	46,XY [14]	46%
	LLA3 _(M)	M	1	46,XY [13]	93%
	LLA4 _(M)	F	3	ND	ND
	LLA5 _(M)	F	19	ND	99%
LMA	LMA1 _(M)	M	26	ND	90%
	LMA2 _(M)	F	90	ND	90%
	LMA3 _(M)	F	64	ND	80%
	LMA4 _(M)	F	84	47, XX, +8	31%
	LMA5 _(M)	F	56	ND	90%
	LMA6 _(M)	M	23	ND	30%
	LMA7 _(M)	F	58	46,XX,t(15;17)(q24;q21)[7]/46,XX[13]	80%
	LMA8 _(M)	F	1	ND	72%
	LMA9 _(M)	M	74	ND	87%
	LMA10 _(M)	F	72	ND	90%
	LMA11 _(M)	F	55	ND	95%
	LMA12 _(M)	F	36	46,XX,t(15;17)(q24;q21)[19]/46,XX[1]	93%
	LMA13 _(M)	M	75	ND	33%
	LMA14 _(M)	F	51	46,XX,t(15;17)(q24;q21)[15]/46,XX[5]	75%
	LMA15 _(M)	F	45	ND	77%
	LMA16 _(M)	M	65	ND	46%
	LMA17 _(S)	M	52	ND	ND

ID: identificação; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; ND: não disponível; M: masculino; F: feminino; idade em anos; ID_(M): amostra coletada da medula; ID_(S): amostra coletada do sangue periférico.

Tabela 04- Distribuição etária, por gênero e características clínicas dos pacientes com TEL.

	ID	Sexo	Idade	Diagnóstico	Compr. Tel. (percentil)	Gene/Mutação na proteína ou RNA
TEL	TEL1 _(s)	F	20	Disceratose Congênita	3,0 kb (<1)	<i>TINF2</i> / p.R282C
	TEL2 _(s)	M	10	Disceratose Congênita	5,3 kb (<10)	<i>DKC1</i> / p.A353V
	TEL3 _(s)	F	16	Medula hipoplástica	5,8 kb (<10)	<i>TERT</i> / p.R865H
	TEL4 _(s)	M	40	Anemia aplástica	4,2 kb (<10)	Sem variante patogênica identificada
	TEL5 _(s)	F	35	Anemia aplástica	5,0 kb (<1)	Sem variante patogênica identificada
	TEL6 _(s)	F	64	ND	4,1 kb (<1)	Sem variante patogênica identificada
	TEL7 _(s)	M	57	Telomeropatia	3,7 kb (<10)	<i>TERC</i> / r.94 C>T
	TEL8 _(s)	M	59	Telomeropatia	5,9 kb (30)	<i>TERT</i> / p.R865H
	TEL9 _(s)	M	27	Telomeropatia	2,9 kb (<1)	<i>TERT</i> / p.R865H

ID: identificação; TEL: telomeropatias; ND: não disponível; M: masculino; F: feminino; idade em anos; kb: quilobases; ID_(s): amostra coletada do sangue periférico; *Isoformas (RefSeq no NCBI) utilizadas para a anotação do sequenciamento: *DKC1*: NM_001363.4, *TERC*: NR_001566.1, *TERT*: NM_198253.2, *TINF2*: NM_012461.

5.2. Mensuração do comprimento telomérico

Com o intuito de avaliar o comprimento telomérico para estabelecer o perfil desse parâmetro nos nossos pacientes, realizamos a mensuração do mesmo através da qPCR. A Figura 7 mostra o comprimento médio dos telômeros, calculado através da razão relativa de T/S. Como esperado, as linhagens celulares VA-13 e HeLa exibiram um maior comprimento telomérico em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (SP e MO), leucemias e telomeropatias ($p < 0,001$). Em contraste, as amostras de LMA e telomeropatias mostraram uma diminuição no comprimento dos telômeros quando comparadas ao grupo saudável (SP) ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente). O mesmo não ocorreu com LLA ($p = 0,21$).

Figura 7- Comprimento médio dos telômeros calculado através da razão relativa de T/S. SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

5.3. Expressão de TERRA por RT-qPCR

Realizou-se a RT-qPCR para verificar a expressão relativa de TERRA das regiões subteloméricas dos cromossomos 10q, 15q, 20q e Xq/Yq (Figura 8). Células VA-13 foram utilizadas como controle interno positivo, pois é uma linhagem com mecanismo de ALT ativo e possui níveis de expressão de TERRA maiores do que linhagens que mantêm seus telômeros por atividade da telomerase (EPISKOPOU et al., 2014; YU; KAO; LIN, 2014). As expressões de TERRA nos pacientes e indivíduos saudáveis são apresentadas como relativas à expressão na linhagem VA-13, estabelecida como sendo de 1.

Células HeLa mostraram uma expressão bastante diminuída em relação à VA-13 em todas as regiões subteloméricas estudadas ($p < 0,01$). As amostras de indivíduos

saudáveis (sangue periférico e medula óssea) também expressaram TERRA em valores dentro do intervalo entre aqueles observados em células HeLa e VA-13 ($p < 0,05$). Ao mesmo tempo, observou-se que, em geral, as amostras de medula óssea (MO) exibiram uma expressão mais baixa que as do sangue periférico (SP) ($p = 0,22$ para 20q, $p = 0,03$ para 15q, $p = 0,12$ para 10q e $p = 0,01$ para Xq/Yq).

Por outro lado (e apesar de certa heterogeneidade), os níveis de TERRA para amostras de LMA foram muito aumentados para todas as regiões subteloméricas estudadas quando comparadas com indivíduos saudáveis ($p < 0,001$ para 20q, $p < 0,0001$ para 10q, e $p < 0,01$ para 15q e Xq/Yq). Em contraste, pacientes com LLA apresentaram grande heterogeneidade, com algumas amostras expressando TERRA em níveis semelhantes ao grupo saudável (SP) ($p > 0,05$), outras exibindo expressão diminuída ($p = 0,10$ para 15q e $p = 0,60$ para 10q) e outras demonstrando aumento na expressão nos cromossomos 20q ($p = 0,50$) e Xq/Yq ($p = 0,70$).

Por fim, os pacientes com telomeropatias apresentaram uma expressão heterogênea de TERRA para 10q, 15q, 20q e Xq/Yq, com algumas amostras exibindo uma expressão relativa semelhante a SP, enquanto outras apresentaram tendência à expressão diminuída ($p = 0,40$ para 20q, $p = 0,80$ para 15q, $p = 0,50$ para 10q e $p = 0,90$ para Xq/Yq).

Figura 8- Expressão relativa de TERRA das regiões subtelôméricas dos cromossomos 10q, 15q, 20q e Xq/Yq. SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

5.4. Expressão de TERT por RT-qPCR

A fim de acessar a relação entre os resultados encontrados nos níveis de expressão de TERRA e a medição do comprimento dos telômeros, realizou-se a expressão de *TERT* por

RT-qPCR (Figura 9). Como esperado, foi observada uma alta expressão de *TERT* em células HeLa (que é positiva para telomerase), enquanto que VA-13, uma linhagem celular que mantém o comprimento dos telômeros pelo mecanismo de ALT, não apresentou expressão.

O grupo saudável (SP e MO) apresentou alguma expressão de *TERT*, com níveis significativamente maiores na medula óssea do que no sangue periférico ($p < 0,01$). Os indivíduos com leucemia (LMA e LLA), assim como HeLa, apresentaram alta expressão de *TERT* na maioria das amostras quando comparados ao grupo saudável (SP) ($p < 0,001$). Finalmente, o grupo das telomeropatias (TEL) exibiu uma expressão de *TERT* com níveis semelhantes aos do SP ($p = 0,55$). Por ser um grupo de doenças que geralmente apresenta aplasia celular, espera-se que a expressão de *TERT* seja baixa ou nula.

Figura 9- Expressão relativa de *TERT* (componente catalítico da telomerase) nos pacientes e indivíduos saudáveis (apresentadas como relativas à expressão na linhagem VA-13, estabelecida como sendo de 1). SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

5.5. Atividade da telomerase

Com o intuito de verificar não somente a expressão gênica da telomerase mas também sua parte funcional, foi realizado o ensaio de atividade da telomerase. Como esperado, a Figura 10 demonstra que, de maneira geral, todas as amostras tiveram uma atividade relativa de telomerase semelhante (ou ainda maior) à expressão de *TERT*. As células HeLa apresentaram alta atividade da telomerase ($p < 0,001$), enquanto VA-13 não exibiu nenhuma ($p > 0,05$). Pacientes com telomeropatias (TEL) apresentaram atividade da telomerase bem baixa, semelhantes ao observado nos indivíduos saudáveis, tanto em sangue periférico (SP) quanto em medula óssea (MO) ($p > 0,05$).

Por outro lado, os grupos leucêmicos (LMA e LLA), de maneira semelhante à HeLa, apresentaram alta atividade na maioria das amostras quando comparados ao grupo saudável ($p < 0,0001$), demonstrando similaridade com o perfil de expressão de *TERRA* encontrado anteriormente, bem como o de expressão de *TERT*.

Figura 10- Atividade relativa da telomerase nos pacientes e indivíduos saudáveis (apresentadas como relativas ao controle padrão presente no kit, estabelecida como sendo de 100). SP: sangue periférico; MO: medula óssea;

LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

5.6. Expressão de TRF2 por RT-qPCR

Estudos prévios sugerem uma possível relação inversa entre *TRF2* e TERRA, com alta expressão de TERRA quando *TRF2* está diminuído e vice-versa. Dessa forma, a expressão relativa de *TRF2* foi medida por RT-qPCR para verificar se esse perfil também seria encontrado em nossas amostras. Na Figura 11, nota-se que os grupos saudáveis (SP e MO) apresentaram níveis de expressão semelhantes ($p > 0,05$), bem como TEL ($p > 0,05$ em relação a SP). Diferentemente, pacientes com leucemia (tanto LLA quanto LMA) apresentaram aumento da expressão de *TRF2* quando comparados a SP para a maioria das amostras ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Nossos resultados sugerem uma relação direta entre *TRF2* e TERRA na LMA, com altos níveis de expressão de ambos nesses indivíduos.

Figura 11- Expressão relativa de *TRF2* (componente do complexo telossomo) nos pacientes e indivíduos saudáveis (apresentadas como relativas à expressão na linhagem VA-13, estabelecida como sendo de 1). SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

5.7. Análise do acúmulo de R-loops por imunofluorescência

Com o intuito de verificar se o aumento de TERRA encontrado nas amostras influenciaria/refletiria na formação de R-loops nestas células, foi realizado o ensaio de imunofluorescência *in situ* em microscópio multifotônico (Figuras 12 e 13). Para tal, utilizou-se o anticorpo S9.6, capaz de detectar a presença de híbridos DNA-RNA (R-loops). Além dos controles celulares (VA-13 e HeLa), algumas amostras foram escolhidas para realizar a análise da detecção de R-loops. A escolha foi baseada nos resultados de expressão de TERRA, sendo selecionados dois indivíduos saudáveis (SP1 e MO2), um paciente com LLA (LLA5), dois pacientes com LMA (LMA1 e LMA7) e um paciente com telomeropatia (TEL9).

A figura 13a (linhagem VA-13 sem o anticorpo primário, S9.6) mostra que a marcação do anticorpo secundário (Alexa Fluor 488) é específica (pois não há marcação), e 13b (VA-13 tratada com RNase H) mostra a diminuição de sinal de S9.6, demonstrando que a marcação é realmente de híbridos DNA-RNA, pois a RNase H é capaz de degradar tais estruturas.

De forma geral, é possível perceber que as amostras de LMA (Figura 13f) tiveram maior intensidade de sinal de fluorescência marcada com S9.6 por núcleo (Figura 12, $p < 0,0001$), bem como VA-13 (Figuras 12 e 13c, $p < 0,01$) e LLA ($p < 0,001$) quando comparadas ao grupo saudável (SP), e em menor grau MO e TEL ($p > 0,05$). HeLa mostrou uma intensidade diminuída (Figuras 12 e 13d, $p < 0,05$). Estes achados vão em concordância com os resultados de expressão de TERRA nas amostras de LMA e sugerem que o acúmulo de R-loops possa ser em decorrência do aumento de TERRA.

Figura 12- Acúmulo de R-loops. O gráfico mostra a mediana da intensidade de sinal de fluorescência por núcleo marcada com o anticorpo S9.6 (que detecta híbridos DNA-RNA). U.A: unidades arbitrárias; SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mielóide aguda; TEL: telomeropatias. $p < 0,05$ em relação a SP (*) (Kruskal-Wallis, seguida de Teste de Dunn).

Figura 13- Detecção de R-loops por imunofluorescência. (a): Ctrl neg (VA-13 sem anticorpo primário); (b): Ctrl (VA-13 tratada com RNase H); (c): VA-13; (d): HeLa; (e): SP1; (f): LMA7. É possível notar a maior intensidade de fluorescência marcada com S9.6 + Alexa Fluor 488 nas amostras (c) e (f), e um sinal diminuído nas amostras (d) e (e).

Com o intuito de verificar se havia relação de proporcionalidade entre os parâmetros da biologia dos telômeros (comprimento telomérico, expressão de *TERT*, *TRF2* e atividade da telomerase) e a expressão de TERRA, um agrupamento hierárquico foi aplicado utilizando todos os resultados obtidos nesse trabalho (Figura 14) através do software MeV 4.9.0 (SAEED et al., 2003). É possível notar a relação inversa entre o comprimento dos telômeros e a expressão de TERRA para todas as regiões subteloméricas avaliadas, bem como a similaridade entre *TERT*, atividade da telomerase (TRAP) e os perfis de expressão de TERRA. Além disso, o agrupamento das amostras de LMA (AML), sangue periférico (PB) e medula óssea (BM) indica um perfil similar dentro de cada grupo para todos os parâmetros avaliados, o que não ocorreu para os indivíduos com LLA (ALL) e telomeropatias (TEL), que ficaram com suas amostras dispersas no agrupamento hierárquico.

Por fim, o agrupamento reforça a ideia de que a expressão de TERRA encontrada nas LMAs é algo específico da doença, e não necessariamente de neoplasias quaisquer ou de células com telômeros curtos (tendo em vista o perfil de expressão diferente encontrado nas amostras de LLA e TEL).

Figura 14- Agrupamento hierárquico realizado no software MeV 4.9.0 utilizando-se todos os resultados obtidos no presente trabalho com o intuito de evidenciar a relação direta/inversa entre os parâmetros avaliados. É possível perceber a relação inversa entre comprimento telomérico e a expressão de TERRA (10q, 15q, 20q e Xq/Yq) encontrada, bem como a semelhança entre *TERT*, atividade da telomerase (TRAP) e o perfil de TERRA. PB: sangue periférico; BM: medula óssea; ALL: leucemia linfoblástica aguda; AML: leucemia mielóide aguda; TEL: telomeropatias. Distância métrica utilizada: Distância Euclidiana; Método de clusterização: “Average linkage clustering”.

6. Discussão

Telômeros são componentes-chave relacionados à divisão e ao envelhecimento celular e, quando sua homeostase é impactada, pode-se gerar instabilidade genômica decorrente do encurtamento telomérico, acúmulo de mutações e falha no mecanismo de resposta a danos no DNA. Como consequência, este conjunto de fatores pode levar à seleção de células anormais e progressão maligna (surgimento de neoplasias) ou à aplasia celular (telomeropatias) (BARTHEL et al., 2017).

No presente estudo, realizou-se a mensuração do comprimento telomérico de neoplasias hematológicas e telomeropatias, bem como de indivíduos saudáveis. Verificou-se que as linhagens-controle (VA-13 e HeLa) mostraram um comprimento telomérico alongado quando comparadas aos outros grupos. Provavelmente este aumento seja devido à ação da telomerase (que é ativa em HeLa) e do mecanismo de ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*, recombinação homóloga) presente na VA-13, que mantêm os telômeros em um comprimento constante e/ou elevado, apesar da alta ciclagem destas células (BROCCOLI; YOUNG; DE LANGE, 1995; EPISKOPOU et al., 2014).

Perturbações da homeostase telomérica têm sido implicadas na patogênese de diferentes neoplasias hematológicas, como leucemias agudas (LLA e LMA), síndrome mielodisplásica (SMD) (CALADO et al., 2009a) e também em doenças complexas relacionadas à biologia aberrante dos telômeros, como disceratose congênita e anemia aplástica (OPRESKO & SHAY, 2017). Nosso trabalho demonstrou que pacientes com LMA e telomeropatias apresentaram um comprimento telomérico diminuído em relação aos grupos saudáveis. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores (CALADO, 2009; WANG et al., 2014; EL BELBESY et al., 2015) e podem estar relacionados à alta ciclagem e acúmulo de danos no DNA levando ao desenvolvimento da instabilidade genômica presente nas neoplasias, e às mutações presentes nas telomeropatias, o que contribui para a patogênese

e o encurtamento dos telômeros (XU; LI; STOHR, 2013; LANSDORP, 2017).

Em células saudáveis altamente replicativas e em neoplasias hematológicas, o encurtamento telomérico pode ser evitado/contrabalanceado pela expressão funcional do complexo enzimático telomerase (VASKO et al., 2017). Desta forma, o presente estudo realizou a mensuração da expressão de *TERT* e da atividade da telomerase, com o intuito de verificar não somente a expressão gênica da mesma, mas também sua parte funcional. Os indivíduos saudáveis apresentaram expressão de *TERT*, com níveis significativamente maiores na medula óssea do que no sangue periférico. É esperado que células da medula óssea, por serem em sua maioria células progenitoras, tenham uma expressão ativa de *TERT*. De maneira semelhante, embora a maioria das células somáticas não apresente, ou apresente níveis muito baixos de atividade da telomerase (MASUTOMI et al., 2003), algumas células (como do sangue periférico) possuem alguma atividade basal da mesma (BROCCOLI; YOUNG; DE LANGE, 1995), o que justificaria os baixos níveis encontrados nas amostras estudadas (XU; LI; STOHR, 2013).

As células de pacientes com leucemias agudas (tanto mieloide quanto linfoblástica), de maneira semelhante à HeLa, apresentaram em sua maioria alta expressão de *TERT*. O gene da transcriptase reversa (*TERT*), componente catalítico da telomerase, é o cerne de sua atividade. Embora a expressão desse gene possa ser modulada em diferentes níveis (tanto pós-transcricional como pós-translacional), a atividade da telomerase é regulada principalmente através do controle transcricional de *TERT* em muitos tipos celulares, e mostra-se aumentada em quase 90% dos cânceres, desempenhando assim um papel crítico na proliferação e potencial de sobrevivência de várias células cancerosas (POOLE; ANDREWS; TOLLEFSBOL, 2001; WU et al., 2013). Ademais, os resultados no ensaio da atividade da telomerase demonstraram um perfil semelhante aos encontrados na expressão de *TERT*, corroborando os mesmos.

Por outro lado, o grupo de pacientes com telomeropatias (TEL) mostrou uma expressão heterogênea de *TERT*, com amostras apresentando pouca ou nenhuma expressão. Por ser um grupo de doenças que geralmente apresenta aplasia celular, é esperado que a expressão de *TERT* seja pequena ou nula (YAMAGUCHI et al., 2005; PAIVA; CALADO, 2014). A falta de padrão nos resultados encontrados pode estar refletindo a instabilidade genômica e as diferentes mutações que podem originar este grupo de doenças.

Na última década, TERRA vem sendo apontado como um importante regulador da homeostase telomérica (ROAKE; ARTANDI, 2017), porém até o presente momento nenhum estudo averiguou seu possível papel em neoplasias hematológicas e telomeropatias, doenças que sabidamente apresentam distúrbios na regulação dos telômeros. Desta forma, o presente trabalho buscou investigar os níveis de expressão de algumas regiões subteloméricas de TERRA em pacientes com LMA, LLA e telomeropatias, bem como de indivíduos saudáveis.

Células de pacientes com LMA mostraram uma expressão muito aumentada de TERRA para todas as regiões subteloméricas estudadas. Em contrapartida, a expressão de TERRA nas amostras de LLA foi inferior em comparação às de LMA, com exceção de algumas amostras em XqYq. A diferença na expressão de TERRA nessas neoplasias poderia em parte ser explicada pelo comprimento telomérico. Foi demonstrado que, em leveduras que possuem telômeros criticamente curtos, a expressão de TERRA é induzida, e estas moléculas transcritas formam agregados com a telomerase (“clusters” TERRA-telomerase), sendo posteriormente recrutados até os telômeros mais curtos (do qual TERRA foi originado), auxiliando a promover seu alongamento (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; SMEKALOVA; BAUMANN, 2013).

Além disso, as amostras de leucemias agudas (mieloide e linfoblástica), de maneira semelhante à HeLa, apresentaram em sua maioria alta expressão de *TERT* e atividade

da telomerase. Esses achados sugerem um importante papel da perda intensa dos telômeros no desenvolvimento da instabilidade genética durante a patogênese da LMA. Supõe-se que o encurtamento crítico dos telômeros em blastos de LMA pode levar ao recrutamento e ativação da telomerase (possivelmente através da expressão de TERRA) e, portanto, prevenir o surgimento da senescência replicativa nos blastos, um possível mecanismo que auxiliaria a seleção clonal e daria suporte à progressão da doença (HARTMANN et al., 2005; WANG et al., 2014; CHU et al., 2017).

Isso poderia explicar os resultados encontrados nas amostras de LMA. A indução de TERRA (em decorrência dos telômeros encurtados) auxiliaria as moléculas de telomerase posteriormente a atuar nos telômeros mais curtos, impedindo assim a senescência e morte destas células, apesar de sua rápida ciclagem (WATTS et al., 2016; LANSBURY, 2017; ROAKE; ARTANDI, 2017). Embora seja paradoxal, frequentemente encontram-se telômeros curtos e telomerase ativa em amostras de LMA (DEVILLE; HILLION; SÉGAL-BENDIRDJIAN, 2009; WANG et al., 2014). De maneira semelhante, explicaria os resultados de LLA, onde a expressão de TERRA mostrou-se diminuída e o comprimento telomérico encontrado nas amostras estudadas foi semelhante aos grupos saudáveis. Todavia, não se pode excluir a possibilidade de que os diferentes resultados encontrados na LMA e LLA possam ser em decorrência de outros mecanismos moleculares ou fatores interindividuais inerentes à cada neoplasia.

Por fim, o grupo de pacientes com telomeropatias (TEL) teve uma expressão heterogênea de TERRA para 10q, 15q, 20q e Xq/Yq. A falta de padrão na expressão de TERRA pode estar refletindo as diferentes mutações (*TERT*, *TERC*, *DKC1* e *TINF2* no nosso estudo) e os diferentes mecanismos moleculares que podem originar este grupo de doenças, que é tão diverso (TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2014), sugerindo

mais uma vez o importante papel que TERRA pode ter na regulação da telomerase (WANG; ZHAO; LU, 2015; ROAKE; ARTANDI, 2017).

Uma função crítica da proteína associada aos telômeros TRF2 (componente do complexo telossomo) é a manutenção da integridade telomérica, protegendo as extremidades dos cromossomos de serem reconhecidas como quebras de dupla-fita de DNA, que conduziria à ativação do processo de resposta e reparo de danos no DNA (PALM; DE LANGE, 2008). Estudos anteriores sugerem uma possível relação inversa entre TRF2 e TERRA, com alta expressão de TERRA quando os níveis de TRF2 apresentavam-se diminuídos e vice-versa (PORRO et al., 2014a).

No presente trabalho notou-se que a expressão de *TRF2* foi menor em indivíduos saudáveis do que em células VA-13. Isso pode ser em decorrência do maior comprimento telomérico presente em VA-13 (e consequentemente, mais moléculas de TRF2 necessárias para formar o telossomo e proteger o telômero aumentado). Uma outra possibilidade seria de que as células saudáveis mostraram uma expressão diminuída por não terem acúmulo de danos no DNA como a linhagem VA-13 pode apresentar (por ser uma linhagem imortalizada e possuir alterações cromossômicas). Já foi sugerido em estudos prévios que a expressão de *TRF2* pode ser aumentada transitoriamente, e a proteína pode sofrer fosforilações em resposta a danos no DNA, ativando vias de sinalização de reparo (como a via ATM, por exemplo) (HUDA et al., 2012).

De maneira diferente, as amostras de leucemia aguda (tanto LMA quanto LLA) tiveram, em sua maioria, uma expressão de *TRF2* aumentada ou similar à VA-13. Desta forma, os resultados encontrados em algumas amostras de LLA corroboram com o enunciado por Porro et al. (2014), apresentando baixos níveis de TERRA e níveis aumentados de *TRF2*. Por outro lado, nossos resultados da expressão de *TRF2* encontrados nas LMAs sugerem uma relação direta entre essa e TERRA, com altos níveis de expressão de ambos nesses indivíduos,

indo em contrapartida ao exposto por Porro. Uma possível explicação seria que o telossomo reage após o estresse provocado pelo dano no DNA, aumentando a atividade da telomerase (possivelmente através de TERRA) e a expressão de *TRF2* em células malignas. Foi previamente demonstrado que a superexpressão de *TRF2* pode reprimir sinais de senescência resultantes de telômeros encurtados (como os presentes nas LMAs) (KLAPPER et al., 2003). Ademais, outros estudos já demonstraram o aumento da expressão de *TRF2* em células leucêmicas (CAPRARO et al., 2011), corroborando nossos resultados.

Em estudos iniciais sobre transcrição de telômeros, uma das primeiras observações foi a associação de TERRA à cromatina telomérica, sugerindo que TERRA tem um importante papel na manutenção da mesma (ROAKE; ARTANDI, 2017). Foi proposto que TERRA forma híbridos de RNA-DNA fisiologicamente relevantes nos telômeros (BALK et al., 2013; ARORA; AZZALIN, 2015; RIPPE; LUKE, 2015; SAGIE et al., 2017). Estes híbridos, referidos como R-loops, levam a estruturas de ácido nucléico de “tripla fita”, onde o híbrido resulta no deslocamento de uma fita de DNA (AGUILERA; GARCÍA-MUSE, 2012).

Por um lado, a formação de R-loops pode regular a manutenção telomérica e influenciar a estabilidade do genoma por diferentes mecanismos, incluindo a promoção da recombinação homóloga entre os telômeros, que pode proteger as forquilhas de replicação do DNA de colapsarem e tornarem-se disfuncionais. Assim, TERRA pode sustentar a replicação do DNA telomérico através da formação de R-loops (BETTIN; OSS PEGORAR; CUSANELLI, 2019). Por outro lado, os R-loops quando não resolvidos podem representar uma ameaça à estabilidade do genoma, com seu acúmulo contribuindo para a ativação da resposta ao dano no DNA (DDR) (GRAF et al., 2017).

Em linhagens de câncer humanas com ALT ativo, bem como em equivalentes de levedura (sobreviventes de “tipo II”), tanto os níveis de TERRA quanto a abundância de híbridos RNA-DNA nos telômeros são regulados positivamente (ARORA et

al., 2014a). Além disso, quando os telômeros se tornam curtos durante a senescência replicativa, a abundância de TERRA aumenta (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; MORAVEC et al., 2016).

Tendo isso em vista, o presente estudo se propôs a verificar se o aumento de TERRA encontrado nas células dos pacientes influenciaria/refletiria na formação de R-loops nestas células através do ensaio de imunofluorescência *in situ* em microscópio multifotônico. Para tal, utilizou-se o anticorpo monoclonal S9.6, que reconhece híbridos DNA-RNA (R-loops) tão pequenos quanto 6-8 pb (PHILLIPS et al., 2013). Os resultados mostraram que as células de pacientes com LMA apresentaram maior intensidade de sinal de fluorescência marcada com S9.6 por núcleo, sugerindo maior acúmulo de R-loops.

Em leveduras, Graf et al. (2017) demonstraram que TERRA e a formação de R-loops nos telômeros é regulada pelo ciclo celular e o estado telomérico. TERRA se acumula no telômero na fase S inicial e é parcialmente removido à medida que a replicação do DNA procede através do DNA telomérico na fase S tardia. No entanto, em telômeros curtos, TERRA e R-loops acumulam-se independentemente do controle do ciclo celular. Em telômeros longos, o recrutamento da RNaseH2 (responsável por degradar híbridos RNA-DNA) por proteínas teloméricas suprime o acúmulo de TERRA – R-loop, mas quando os telômeros encurtam, essas proteínas de recrutamento e a RNaseH2 são diminuídas. Consequentemente, a coordenação da replicação telomérica com a degradação de TERRA é alterada nos telômeros encurtados, e a persistência de R-loops em telômeros curtos pode contribuir para a ativação da DDR, prevenindo a senescência prematura (GRAF et al., 2017; ROAKE; ARTANDI, 2017).

Nossos resultados vão em concordância com os de Graf et al. (2017), sugerindo que, em células de pacientes com LMA, os telômeros criticamente curtos incitam a transcrição de TERRA e seu acúmulo na forma de TERRA – R-loops. O aumento de TERRA

auxiliaria na sinalização e recrutamento da telomerase para os telômeros encurtados, como sugerido por Cusanelli et al., (2013). Além disso, o acúmulo de TERRA – R-loops é importante para permitir que a ativação da DDR ocorra (juntamente com o aumento transitório de *TRF2*), prevenindo o início precoce da senescência, auxiliando a seleção clonal e dando suporte à progressão da doença (BOWER; GRIFFITH, 2014; MORAVEC et al., 2016; LEE et al., 2018). Ou seja, nossos achados sugerem que o acúmulo de R-loops ajuda a sustentar a instabilidade dos telômeros nas LMAs.

7. Conclusão

Nossos dados sugerem que a expressão de TERRA é maior em amostras de LMA em comparação a células hematopoéticas de SP e MO, bem como a expressão de *TERT*, *TRF2* e atividade da telomerase. De maneira oposta, o grupo das telomeropatias apresentaram níveis semelhantes aos encontrados nas amostras de indivíduos saudáveis.

Além disso, foi observado o inverso na mensuração do comprimento telomérico, com níveis diminuídos deste nas LMAs e TELs quando comparados a SP e MO. Ademais, a expressão de TERRA parece não depender apenas do comprimento telomérico, uma vez que em amostras de sangue de pacientes com TEL os níveis de TERRA não são elevados. Por fim, há acúmulo de R-loops em amostras de LMA e LLA, o que não foi observado nas TELs.

Esta é a primeira descrição de expressão de TERRA em células hematopoéticas humanas normais e neoplásicas. Nossos resultados indicam que o aumento da transcrição de TERRA é uma característica de blastos na leucemia mieloide aguda e não somente de células com telômeros curtos. A presença de TERRA formando R-loops na LMA podem auxiliar na manutenção dos seus telômeros mais curtos e prevenir a senescência. Desta forma, TERRA parece atuar como um importante modulador na etiologia das leucemias mielóides agudas, fornecendo um maior entendimento de como estas doenças surgem e se desenvolvem, o que poderia se traduzir em ações terapêuticas no futuro.

8. Bibliografia

- AALBERS, A. M., et al. Telomere Length and Telomerase Complex Mutations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 120, n. 27, p. 1786–1789, 2013.
- AGUILERA, A.; CIMPRICH, K. A. promote R-loop-induced genome instability. v. 56, n. 6, p. 777–785, 2015.
- AGUILERA, A.; GARCIA-MUSE, T. R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. **Molecular Cell**, v. 46, n. 2, p. 115–124, 2012.
- ARMANIOS, M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. **Mutation research**, v. 730, n. 1–2, p. 52–8, 1 fev. 2012.
- ARNOULT, N.; VAN BENEDEN, A.; DECOTTIGNIES, A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α . **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 9, p. 948–956, 2012.
- ARORA, R.; AZZALIN, C. M. Telomere elongation chooses TERRA ALternatives. **RNA Biology**, v. 12, n. 9, p. 938–941, 2 set. 2015.
- ARORA, R., et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–11, 2014a.
- AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–36, 2015.
- AZZALIN, C. M., et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2007.
- BALK, B., et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20, n. 10, p. 1199–1205, 2013.
- BARTHEL, F. P., et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. **Nature Genetics**, v. 49, n. 3, p. 349–357, 2017.
- BENETTI, R.; SCHOEFTNER, S.; MUÑOZ, P.; BLASCO, M. A. Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 21, p. 3461–8, 1 nov. 2008.
- BERTUCH, A. A. ; GRAMATGES, M. M. Short Telomeres: From Dyskeratosis Congenita to Sporadic Aplastic Anemia and Malignancy. **Translational research**, v. 162, n. 6, p. 997–1003, 2013.
- BETTIN, N.; OSS PEGORAR, C.; CUSANELLI, E. The Emerging Roles of TERRA in Telomere Maintenance and Genome Stability. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 246, 2019.
- BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 661–73, 21 set. 2001.
- BOWER, B. D.; GRIFFITH, J. D. TRF1 and TRF2 Differentially Modulate Rad51-Mediated Telomeric and Nontelomeric Displacement Loop Formation *in Vitro*. **Biochemistry**, v. 53, n. 34, p. 5485–5495, 2 set. 2014.
- BROCCOLI, D.; YOUNG, J. W.; DE LANGE, T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9082–6, 1995.

- BRUMMENDORF, T. H. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. **Blood**, v. 97, n. 4, p. 895–900, 15 fev. 2001.
- CALADO, R. T. Telomeres and marrow failure. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 338–43, jan. 2009.
- CALADO, R. T.; DUMITRIU, B. Telomere Dynamics in Mice and Humans. **Seminars in Hematology**, v. 50, n. 2, p. 165–174, abr. 2013.
- CALADO, R. T., et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1187–1192, 27 jan. 2009a.
- CALADO, R. T., et al. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7926, jan. 2009b.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4446–55, 1 maio 2008.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–65, 10 dez. 2009.
- CAPRARO, V., et al. Telomere deregulations possess cytogenetic, phenotype, and prognostic specificities in acute leukemias. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 2, p. 195–202, 2011.
- CASLINI, C., et al. MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4519–26, ago. 2009.
- CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 10, p. e47, 2002.
- CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. e21–e21, 7 jan. 2009.
- CHIBA, K., et al. Mutations in the promoter of the telomerase gene *TERT* contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1416–1420, 29 set. 2017.
- CHU, H. P., et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 86–101.e16, 2017.
- COGAN, J. D., et al. Rare Variants in *RTEL1* Are Associated with Familial Interstitial Pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 6, p. 646–655, 15 mar. 2015.
- COUNTER, C., et al. Telomerase Activity in Normal Leukocytes and in Hematologic Malignancies. **Blood**, v. 85, n. 9, p. 2315–2320, 1 maio 1995.
- CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 5, n. 3, p. 407–19, 2014.
- CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. April, p. 1–9, 2015.
- CUSANELLI, E.; ROMERO, C.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 780–791, 2013.
- DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.

Genes & development, v. 19, n. 18, p. 2100–10, 15 set. 2005.

DE LANGE, T. How telomeres solve the end protection problem. **Science**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2009.

DENG, Z., et al. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. **Molecular cell**, v. 35, n. 4, p. 403–13, 28 ago. 2009.

DEVILLE, L.; HILLION, J.; SÉGAL-BENDIRDJIAN, E. Telomerase regulation in hematological cancers: a matter of stemness? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 4, p. 229–39, abr. 2009.

DU, H.-Y., et al. TINF2 mutations in children with severe aplastic anemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 52, n. 5, p. 687, maio 2009.

EL-MAZNY, A.; SAYED, M.; SHARAF, S. Human telomerase reverse transcriptase messenger RNA (TERT mRNA) as a tumour marker for early detection of hepatocellular carcinoma. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 2, p. 68–71, jun. 2014.

EL BELBESY, S. F., et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) level in patients with acute myeloid leukemia: Impact on clinical outcome. **Acta Haematologica Polonica**, v. 46, n. 4, p. 304–311, set. 2015.

EPISKOPOU, H., et al. Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 7, p. 4391–4405, 2014.

FEUERHAHN, S., et al. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3812–3818, 2010.

FRANK, A. K., et al. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. **PLoS genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005410, jul. 2015.

GRAF, M., et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 72–85.e14, 2017.

GREENWOOD, J.; COOPER, J. P. Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2956–2963, 2012.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F., et al. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113747, 19 nov. 2014.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, p. 458–60, 31 maio 1990.

HARTMANN, U., et al. Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities. **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 307–316, 2005.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental cell research**, v. 25, p. 585–621, dez. 1961.

HISATA, S., et al. A Novel Missense Mutation of DKC1 In Dyskeratosis Congenita With Pulmonary Fibrosis. **Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG**, v. 30, n. 3, p. 221–5, 25 nov. 2013.

HOUGHTALING, B. R.; CANUDAS, S.; SMITH, S. A role for sister telomere cohesion in telomere elongation by telomerase. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 1, p. 19–25, 1 jan. 2012.

- HUDA, N., et al. Recruitment of TRF2 to laser-induced DNA damage sites. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 5, p. 1192–1197, 2012.
- KANNENGISSER, C.; BORIE, R.; REVY, P. Pulmonary fibrosis associated with TINF2 gene mutation: is somatic reversion required? **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 1, p. 269–270, 1 jul. 2014.
- KLAPPER, W.; QIAN, W.; SCHULTE, C.; PARWARESCH, R. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 17, n. 10, p. 2007–2015, 2003.
- KREILMEIER, T., et al. Telomere Transcripts Target Telomerase in Human Cancer Cells. **Genes**, v. 7, n. 8, p. 46, 16 ago. 2016.
- KROPSKI, J. A.; BLACKWELL, T. S.; LOYD, J. E. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. **The European respiratory journal**, v. 45, n. 6, p. 1717–27, jun. 2015.
- LANSDORP, P. M. Maintenance of telomere length in AML. **Blood Reviews**, v. 1, n. 25, p. 1–6, 2017.
- LEE, Y. W.; ARORA, R.; WISCHNEWSKI, H.; AZZALIN, C. M. TRF1 participates in chromosome end protection by averting TRF2-dependent telomeric R loops. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 147–153, 2018.
- LUKE, B.; LINGNER, J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. **The EMBO journal**, v. 28, n. 17, p. 2503–10, 2 set. 2009.
- LUKE, B., et al. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular cell**, v. 32, n. 4, p. 465–77, 21 nov. 2008.
- MASUTOMI, K., et al. Telomerase Maintains Telomere Structure in Normal Human Cells. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 241–253, 2003.
- MITCHELL, J. R.; WOOD, E.; COLLINS, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. **Nature**, v. 402, n. 6761, p. 551–555, 2 dez. 1999.
- MONTERO, J. J., et al. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. **Nature Communications**, v. 7, p. 12534, 17 ago. 2016.
- MORAVEC, M., et al. TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO reports**, v. 17, n. 7, p. 999–1012, 1 jul. 2016..
- NERGADZE, S. G., et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 2009.
- O'SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 171–81, mar. 2010.
- OHYASHIKI, J. H., et al. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. **Oncogene**, v. 21, n. FEBRUARY, p. 680–687, 2002.
- OPRESKO, P. L.; SHAY, J. W. Telomere-associated aging disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 33, p. 52–66, 1 jan. 2017.
- OSTERWALD, S., et al. PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. **J Cell Sci**, v. 128, n. 10, p. 1887–1900, 2015.
- PAIVA, R. M. a; CALADO, R. T. **Telomere dysfunction and hematologic disorders**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 125

- PALM, W.; DE LANGE, T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 301–334, 2008.
- PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e–36, 1 maio 2002.
- PHILLIPS, D. D., et al. The sub-nanomolar binding of DNA-RNA hybrids by the single-chain Fv fragment of antibody S9.6. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 8, p. 376–381, 1 ago. 2013.
- POOLE, J. C.; ANDREWS, L. G.; TOLLEFSBOL, T. O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). **Gene**, v. 269, n. 1, p. 1–12, 2001.
- PORRO, A., et al. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. **Nat Commun**, v. 5, p. 5379, 2014a.
- PORRO, A.; FEUERHAHN, S.; REICHENBACH, P.; LINGNER, J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 20, p. 4808–4817, 2010.
- RINELLI, M., et al. Structural modeling of a novel TERC variant in a patient with aplastic anemia and short telomeres. **Annals of Hematology**, 6 jul. 2018.
- RIPPE, K.; LUKE, B. TERRA and the state of the telomere. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 11, p. 853–858, 2015.
- RISITANO, A. M., et al. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR β -CDR3 sequencing. **The Lancet**, v. 364, n. 9431, p. 355–364, jul. 2004.
- ROAKE, C. M.; ARTANDI, S. E. Approaching TERRA Firma: Genomic Functions of Telomeric Noncoding RNA. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 8–9, 2017.
- SAEED, A. I., et al. TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. **BioTechniques**, v. 34, n. 2, p. 374–378, fev. 2003.
- SAGIE, S., et al. Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.
- SALHAB, M.; JIANG, W. G.; NEWBOLD, R. F.; MOKBEL, K. The expression of gene transcripts of telomere-associated genes in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters and clinical outcome. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 109, n. 1, p. 35–46, 7 maio 2008.
- SAMPL, S., et al. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. **Translational oncology**, v. 5, n. 1, p. 56–65, 2012.
- SASA, G. S., et al. Three novel truncating TINF2 mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood. **Clinical genetics**, v. 81, n. 5, p. 470–8, maio 2012.
- SAVAGE, S. a. **Human telomeres and telomere biology disorders**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 125
- SCHINDELIN, J., et al. Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 228–236, 2008.

- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 2, p. 186–93, maio 2010.
- SHAY, J. W. Telomeres and aging. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 52, p. 1–7, 1 jun. 2018.
- SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hayflick, his limit and cellular ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 72–76, 1 out. 2000.
- SMEKALOVA, E.; BAUMANN, P. TERRA -A Calling Card for Telomerase. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 703–704, 2013.
- SNIJEDERS, P. J. F., et al. Elevated hTERT mRNA levels: A potential determinant of bronchial squamous cell carcinoma (in situ). **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 3, p. 412–417, 10 abr. 2004.
- STEWART, J. A.; CHAIKEN, M. F.; WANG, F.; PRICE, C. M. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. **Mutation research**, v. 730, n. 1–2, p. 12–9, 1 fev. 2012.
- TERRIN, L., et al. Relationship Between Tumor and Plasma Levels of hTERT mRNA in Patients with Colorectal Cancer: Implications for Monitoring of Neoplastic Disease. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 22, p. 7444–7451, 15 nov. 2008.
- TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood Reviews**, v. 124, n. 18, p. 2775–2784, 2014.
- TSAKIRI, K. D., et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7552–7557, 1 maio 2007.
- VASKO, T., et al. Telomeres and telomerase in hematopoietic dysfunction: Prognostic implications and pharmacological interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 1–14, 2017.
- VULLIAMY, T. J., et al. Differences in Disease Severity but Similar Telomere Lengths in Genetic Subgroups of Patients with Telomerase and Shelterin Mutations. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24383, 13 set. 2011.
- VULLIAMY, T., et al. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. **Nature genetics**, v. 36, n. 5, p. 447–9, maio 2004.
- WAHBA, L., et al. S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation. **Genes and Development**, v. 30, n. 11, p. 1327–1338, 2016.
- WALNE, A. J., et al. Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 334–8, mar. 2013.
- WALNE, A. J., et al. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3594–600, 1 nov. 2008.
- WANG, C.; ZHAO, L.; LU, S. Role of TERRA in the Regulation of Telomere Length. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 3, p. 316–323, 2015.
- WANG, L., et al. The role of telomeres and telomerase in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

- WATTS, J. M., et al. Telomere length and associations with somatic mutations and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. **Leukemia research**, v. 49, p. 62–5, 1 out. 2016.
- WINKLER, T., et al. Defective Telomere Elongation and Hematopoiesis from Telomerase-Mutant Aplastic Anemia iPSCs. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 5, p. 1952–63, 1 maio 2013.
- WOLTERS, P. J.; COLLARD, H. R.; JONES, K. D. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 157–79, 2014.
- WU, X., et al. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: New insight into the evolving field of telomerase in cancer. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2462–2468, 2013.
- XU, L.; LI, S.; STOHR, B. A. The Role of Telomere Biology in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 49–78, 2013.
- YAMAGUCHI, H., et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 14, p. 1413–24, 7 abr. 2005.
- YEHEZKEL, S., et al. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 18, p. 2776–89, 15 set. 2008.
- YEHEZKEL, S., et al. Characterization and rescue of telomeric abnormalities in ICF syndrome type I fibroblasts. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 35, jan. 2013.
- YOUNG, N. S. Acquired Aplastic Anemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 7, p. 534, 2 abr. 2002.
- YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the new telomere diseases: practice and research. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 17 Suppl 1, p. S18-21, abr. 2012.
- YU, T. Y.; KAO, Y. W.; LIN, J. J. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 9, p. 3377–3382, 2014.
- ZHANG, Q.; KIM, N.-K.; FEIGON, J. Architecture of human telomerase RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 51, p. 20325–32, 20 dez. 2011.