UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA, CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

ANDRÉ LUIZ PINTO SANTOS

Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros

Ribeirão Preto - SP
2018

ANDRÉ LUIZ PINTO SANTOS

Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros

Versão original

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

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

Ribeirão Preto - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CARTOGRÁFICA

PINTO, André Luiz

Avaliação da Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros - Ribeirão Preto, 2018

73 p.: il. ; 30 cm

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: CALADO, Rodrigo Tocantins

1. Telômero. 2. Telomeropatia. 3.Mitocôndria.

Nome: PINTO, André Luiz

Título: Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

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

Aprovado em: ___/___/_____

Banca examinadora

Orientador: Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
  - Bolsa de mestrado no país: 2016/03620-8
    Período: 01/09/2016 a 30/06/2018
  - Regular: 2016/12799-1
  - Centro de Terapia Celular – CTC (CEPID):

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
  - Bolsa de mestrado
    Período: 01/07/2016 a 31/08/2016

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
  - INCT em Células-Tronco e Terapia Celular no Câncer
  - Bolsa DTI
    Períodos: 01/12/2015 a 30/06/2016 e 01/07/2018 a 31/12/2018

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC-FMRP-USP)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Rodrigo Calado, a quem devo a parte mais importante da minha formação científica. Obrigado por fortalecer meu senso crítico, por me desafiar sempre e confiar em mim quando foi preciso.

À Dra Luciane Alberici e sua equipe por me introduzir no encantador mundo das mitocôndrias. Obrigado pelos ensinamentos e pela estrutura que me forneceu.

À Flávia Donaires, fiel companheira nas labutas diárias e pessoa indispensável nesse e em todos os trabalhos que me envolvi durante o mestrado. Obrigado também pela amizade e por falar tantas bobagem tornando nossos dias menos difíceis. Saiba que tenho grande admiração por você.

Á Lílian que dedicou seu precioso tempo para me ajudar nesse projeto com suas invejáveis “habilidades culturais”. Obrigado pelo companheirismo de sempre.

Á Raquel que me recebeu como uma “mãezona” neste laboratório e fez nascer o projeto que hoje concluo. Agradeço também a Fernanda Gutierrez por tanto conhecimento transmitido no pouco tempo que trabalhamos juntos.

À Fernanda Borges e Ana Paula, por me aturar por quase 3 anos, numa convivência diuturna. Obrigado pela amizade, meninas!

A João Paulo, Jaqueline, Ritinha, Bárbara, Florência, Bruna, Bruno, Luiz Fernando e Dalvinha, companheiros de trabalho que também escolhi como amigos.

Aos meus primos Eraldo Jr e Andrea Sambini e aos tios Rita e Eraldo, por serem como um porto seguro nessas terras distantes das minhas raízes. Obrigado pelos conselhos, incentivos, risadas e carinhos.

Aos meus queridos irmãos, Vinícius e Manu, fiéis incentivadores da minha caminhada e fortalezas nas minhas ausências. Que sigamos sempre unidos para retribuirmos juntos tudo o que nossos pais heróis nos proporcionaram.

Aos meus pais, Emanuel e Elizabete, as pessoas mais importantes da minha vida, fonte primordial de tudo que eu tenho/sou e do que ainda conquistarei. Eles me ensinaram a responsabilidade que o mundo me cobra diariamente e a honestidade dos homens bons.

À Deus, o criador de todas as leis naturais e sobrenaturais, a quem pude conhecer melhor em meio a tantas possibilidades que a academia/razão nos oferece.

“Quem deixa sua casa para dedicar-se à Ciência, segue os caminhos de Deus”

Maomé (571 d.C – 632 d.C)

RESUMO

PINTO, AL. **Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros.** 2018. 73f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2018.

Mutações em genes da biologia dos telômeros, causando o seu encurtamento, são as bases moleculares de um grupo heterogêneo de doenças denominadas telomeropatias. O protótipo das telomeropatias é a disceratose congênita (DC), uma falência de medula óssea, caracterizada por sinais mucocutâneos e anemia aplástica (AA). Além da DC e AA, a fibrose pulmonar (FP) e a cirrose hepática (CH) também fazem parte do espectro das telomeropatias. Como pulmão e fígado são órgãos com baixa taxa proliferativa, suspeita-se que existe outros componentes celulares interagindo com os telômeros para o estabelecimento dessas doenças. Diferentes abordagens vêm estabelecendo uma relação entre e a biologia dos telômeros e as mitocôndrias. No entanto, ainda não se sabia sobre o funcionamento mitocondrial em células primárias de pacientes com telomeropatias. No nosso estudo, utilizamos fibroblastos dermais de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes (n=6), diagnosticados com diferentes telomeropatias (AA, DC, FP e CH) e telômeros abaixo do 10º percentil (curtos para a idade). Ao avaliarmos parâmetros mitocondriais, observamos um fenótipo senescente, nas células dos pacientes, que refletiu num aumento na massa mitocondrial (85%), no número de copias de DNA mitocondrial, no consumo de oxigênio (71%) e na produção de superóxidos (74%), precursor das espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais. O superóxido levou a um aumento na expressão de antioxidantes, como a SOD1 e a UCP1. Dessa maneira, o estresse oxidativo gerado pelas EROs mitocondriais parece ter um papel fundamental na patogênese das telomeropatias. Além disso, sequenciamos amostras de sangue periférico de outros 72 pacientes com falência medular, com telômeros curtos e normais, para compararmos a taxa de variantes somáticas entre os grupos. Observamos que os pacientes com falência medular e telômeros curtos apresentaram maiores frequências de variantes somáticas. Supomos que o aumento da taxa de variantes somáticas possa ser consequência do desequilíbrio redox, observado nas células dos pacientes, causando danos no DNA das células-tronco hematopoéticas.

Estudos como esse podem basear discussões sobre o uso de terapias antioxidantes em pacientes com telomeropatias.

Palavras-chaves: Telômero, telomeropatia, mitocôndria

ABSTRACT

PINTO, A L. **Mitochondrial function in mice and human patients with telomere disorders.** 2018. 73f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

Mutations in telomere-related genes are the molecular basis of a phenotypically heterogeneous group of disorders that are collectively termed telomeropathies. The prototype of telomeropathies is the dyskeratosis congenita (DC), an inherited bone marrow failure characterized by mucocutaneous stigmata and aplastic anemia (AA). In murine telomerase knockout models, telomere shortening provokes mitochondrial deficiency and increases reactive oxygen species (ROS) production. However, the mitochondrial function in human telomeropathies has not been addressed. We evaluated mitochondrial parameters in fibroblasts from four healthy individuals (controls) and six patients with inherent bone marrow failure (DC and AA), carrying pathogenic variants in *TERC*, *DKC1*, *RTEL1* and *POT1* genes and, consequently, telomere shortening (<10th percentile). Patient fibroblasts displayed an 85% increment in mitochondrial mass, resulting in a 71% increase in oxygen consumption in the state of maximum respiration (ETS) compared to controls. As a consequence, mitochondrial ROS production was 74% higher in patients' fibroblasts than in controls. Increased ROS level may explain the overexpression of SOD1 and UCP1 observed in patient cells. We further assessed the mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in fibroblasts and peripheral blood of patients with telomere shortening. The mtDNA content was significantly higher in patients compared to controls. These findings indicate that mitochondria are affected in human telomere diseases and may play a role in disease development. Furthermore, overproduction of mitochondrial ROS could induce oxidative stress and result in somatic mutations in hematopoietic stem-cells, causing clonal disorders in patients with telomeropathies.

Key-words: Telomere, telomeropathy, mitochondria

Figuras

Figura 1 – Componentes da biologia dos telômeros 16
Figura 2 – Comprimento telomérico de pacientes com telomeropatia.....17
Figura 3 – Fenótipos da disceratose congênita.....17
Figura 4 – Insuficiência medular causada por erosão telomérica.....18
Figura 5 – Cadeia transportadora de elétrons.....20
Figura 6 – Representação esquemática dos ensaios realizados no estudo.....26
Figura 7 – Representação do ensaio de respirometria com células intactas 29
Figura 8 – Representação do ensaio de respirometria com tecido hepático.....30
Figura 9 – Representação do ensaio de respirometria com tecido pulmonar 31
Figura 10 – Respirometria com tecido hepático de camundongos.....38
Figura 11 – Respirometria com tecido pulmonar de camundongos 38
Figura 12 – Respirometria com medula óssea de camundongos.....39
Figura 13 – Comprimento telomérico de camundongos.....39
Figura 14 – Cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) em fibroblastos humanos.....40
Figura 15 – Massa mitocondrial de fibroblastos humanos 41
Figura 16 – Respirometria com fibroblastos humanos 41
Figura 17 – Espécie reativa de oxigênio (ERO) de fibroblastos humanos 42
Figura 18 – Respirometria com células-tronco pluripotentes induzidas humanas.....42
Figura 19 – Cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) de sangue periférico 43
Figura 20 – Número de cópias de DNA mitocondrial e comprimento telomérico 43
Figura 21 – Mapa de calor (*heatmap*) dos genes diferencialmente expressos 44
Figura 22 – Porcentagem de pacientes com variantes somáticas 46
Figura 23 – *Violin plot* do número de variantes somáticas.....46
Figura 24 – *Violin plot* de frequência alélica das variantes somáticas.....47
Figura 25 – Figura resumo 53

Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas dos doadores de fibroblastos.....28
Tabela 2 – Sequências de *primers* para quantificação de DNA mitocondrial.....32
Tabela 3 – Painel gênico.....35

Siglas

AA - anemia aplástica

CCCP - carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CCP - *coupling control protocols*

CH - cirrose hepática

CTE - cadeia transportadora de elétrons

CTH - célula-tronco hematopoética

DC - disceratose congênita

Dkc1^{m} - camundongos hipomórficos para o gene *Dkc1*

ERO - espécie reativa de oxigênio

ETS - capacidade máxima de transporte de elétrons (do inglês, *electron transfer system*)

FAD - dinucleótido de flavina e adenina

FPI - fibrose pulmonar idiopática

HC - hematopoese clonal

Indel - mutação do tipo inserção ou deleção

iPSCs - células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced pluripotent stem cells*)

kb - quilobases

LMA - leucemia mieloide aguda

MiR05 - meio de respiração mitocondrial

mtDNA - DNA mitocondrial

NAD - dinucleótido de nicotinamida e adenina

NGS - sequenciamento de nova geração (do inglês, *next generation sequencing*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

SMD - síndrome mielodisplásica

SNV - variante de um único nucleotídeo (do inglês, *single variant nucleotide*)

TCA - ciclo do ácido tricarboxílico (do inglês, *tricarboxylic cycle acid*)

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TMO - transplante de medula óssea

VCF - *variant calling file*

Wt - selvagens (do inglês, *wild type*)

SUMÁRIO

1 Introdução 15
1.1 Telômero e telomerase 15
1.2 Telomeropatias 16
1.3 Telômeros e mitocôndria 19
2 Objetivos 24
2.1 Objetivo Geral 24
2.2 Objetivos Específicos 24
3 Material e métodos 26
3.1 Modelo murino 26
3.2 Coleta de sangue periférico e extração de DNA 27
3.3 Coleta e cultivo dos fibroblastos 28
3.4 Ensaios de respirometria de alta resolução 29
3.5 Quantificação da produção de ERO e da massa mitocondrial 31
3.6 Número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) 32
3.7 Avaliação do comprimento telomérico 33
3.8 Extração de RNA, preparo do cDNA e PCR em tempo real 34
3.9 Sequenciamento de nova geração 34
3.9.1 Preparo das bibliotecas 34
3.9.2 Sequenciamento massivo em paralelo 35
3.9.3 Análise e filtragem de variantes 36
4 Resultados 37
4.1 Não há diferença entre a respiração mitocondrial dos animais do grupo controle (Wt) e *Dkc1* hipomórfico ($Dkc1^m$) 37
4.2 Os fibroblastos dos pacientes possuem mais DNA e massa mitocondrial, consomem mais oxigênio e produzem mais ERO mitocondrial 40
4.3 Os leucócitos do sangue periférico dos pacientes com telomeropatias também possuem maior número de cópias de DNA mitocondrial 43
4.4 Genes ligados a biogênese mitocondrial, estresse oxidativo, translocases e transportadores mitocondriais estão diferencialmente expressos nos pacientes 44
4.5 Pacientes com telômeros curtos apresentam mais variantes somáticas 45
5 Discussão 49
6 Conclusões 55
7 Referências 57

Apêndice A – Tabela de características clínicas dos pacientes e suas respectivas variantes somáticas (filtradas) 66
Apêndice B – Tabela de pacientes e indivíduos saudáveis (controles) usados na quantificação de DNA mitocondrial (mtDNA) 69
Apêndice C - Mapa de calor (*heatmap*) completo. 70
Anexo 1 – Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) 72
Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em humanos 73

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Telômero e telomerase

Os telômeros de mamíferos são formados por repetições de sequências nucleotídicas 5'-TTAGGG-3', localizadas nas extremidades cromossômicas, tendo como principal função proteger a integridade do material genético contra a degradação decorrente da replicação e da ação de exonucleases (BLACKBURN, 1991). Um conjunto de seis proteínas (TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 e POT1) interage com às repetições teloméricas formando um complexo nucleoproteico conhecido como telossomo (LIU et al., 2004; DE LANGE, 2005). As proteínas do telossomo fornecem estabilidade aos telômeros, permitindo a formação de um laço (no inglês, *T-loop*) que esconde as extremidades da molécula de DNA (GRIFFITH et al., 1999; DE LANGE, 2004).

Em células somáticas humanas, essas repetições teloméricas podem chegar a 15 quilobases (kb) (MEYNE; RATLIFF; MOYZIS, 1989). Em camundongos, esse comprimento é bem maior, atingindo cerca de 100 kb (KIPLING; COOKE, 1990). A cada divisão celular há um encurtamento dos telômeros, devido à incapacidade da DNA polimerase em replicar completamente a parte final dos cromossomos lineares. O problema da replicação das extremidades foi denominado "teoria da marginotomia" por Olovnikov (1973). Essa teoria explica os resultados de Leonard Hayflick e Paul Moorhead que, em 1961, observaram que fibroblastos humanos se dividiam aproximadamente 50 vezes e logo entravam em senescência replicativa (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). Tal fenômeno ficou conhecido como "limite de Hayflick".

A erosão dos telômeros é atenuada em células com alta capacidade proliferativa devido à atividade de uma transcriptase reversa, a telomerase, que catalisa a adição de novas repetições teloméricas mantendo o seu comprimento (GREIDER; BLACKBURN, 1985). Essa enzima, TERT (do inglês, *telomerase reverse transcriptase*), forma um complexo associando-se a um componente de RNA, TERC (do inglês, *telomerase RNA component*), que fornece o molde para adição de novas repetições. A discerina (codificada pelo gene *DKC1*), NHP2, NOP10 e GAR1 estabilizam o complexo da telomerase (LINGNER et al., 1997). Outras proteínas, como TCAB1, o complexo CST, RTEL1 e PARN, também são fundamentais para manutenção e reparo dos telômeros (figura 1).

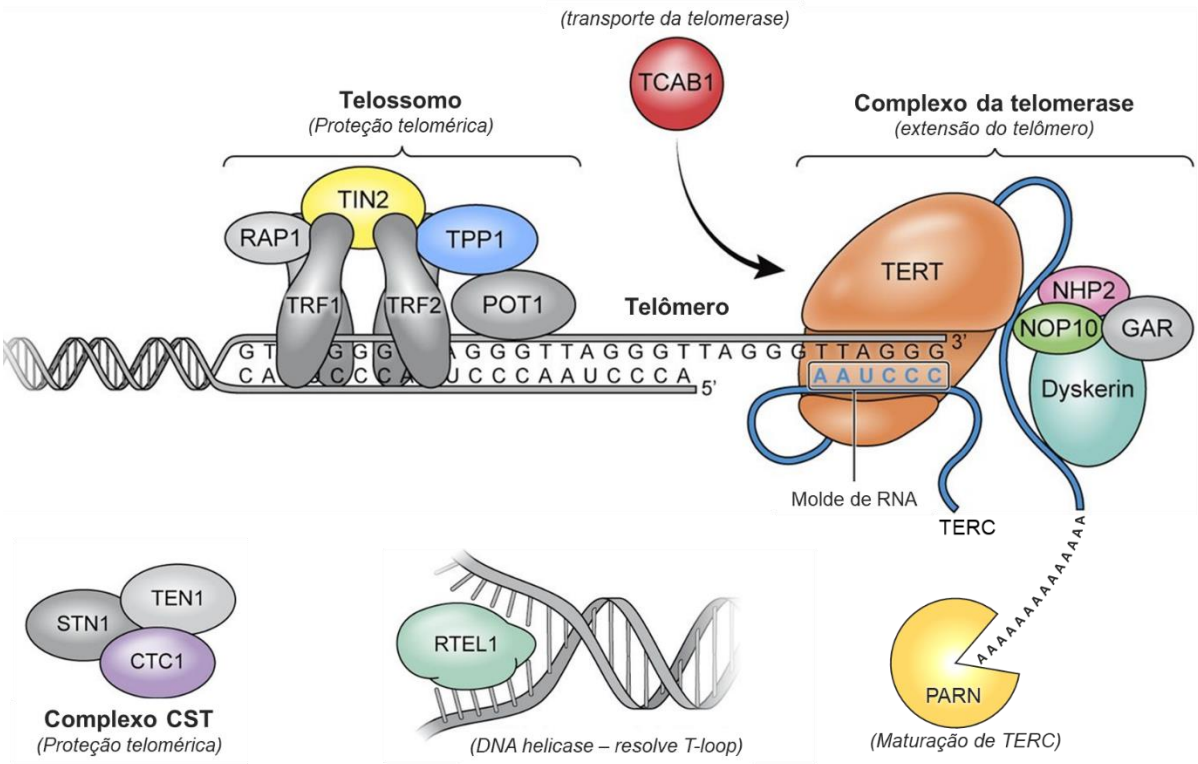


Figura 1 – Componentes da biologia dos telômeros
Modificado de Townsley *et al.*, Blood (2014)

1.2 Telomeropatias

Há pouco mais de uma década, o estudo da biologia dos telômeros avançou em direção às implicações clínicas. Doenças com sintomas, prognósticos e tratamentos distintos, como a anemia aplástica (AA), a fibrose pulmonar idiopática (FPI) e a cirrose hepática (CH) podem ter em comum o encurtamento excessivo dos telômeros (PAIVA; CALADO, 2014). A disfunção telomérica é a base molecular de um grupo de doenças coletivamente denominadas telomeropatias ou doenças dos telômeros. Geralmente, os pacientes acometidos apresentam telômeros abaixo do 10º percentil, considerados curtos para idade quando comparando a curva de comprimentos teloméricos de indivíduos saudáveis (figura 2). Essa erosão telomérica acentuada é consequência de mutações nos genes de manutenção e reparo dos telômeros, as quais, em geral, prejudicam a função do complexo da telomerase (CALADO; YOUNG, 2009). Dessa forma, células-tronco de tecidos altamente proliferativos, como as células-tronco hematopoéticas (CTHs), entram precocemente em senescência replicativa e/ou apoptose, o que resulta na aplasia medular presente na maioria dos pacientes com telomeropatias.

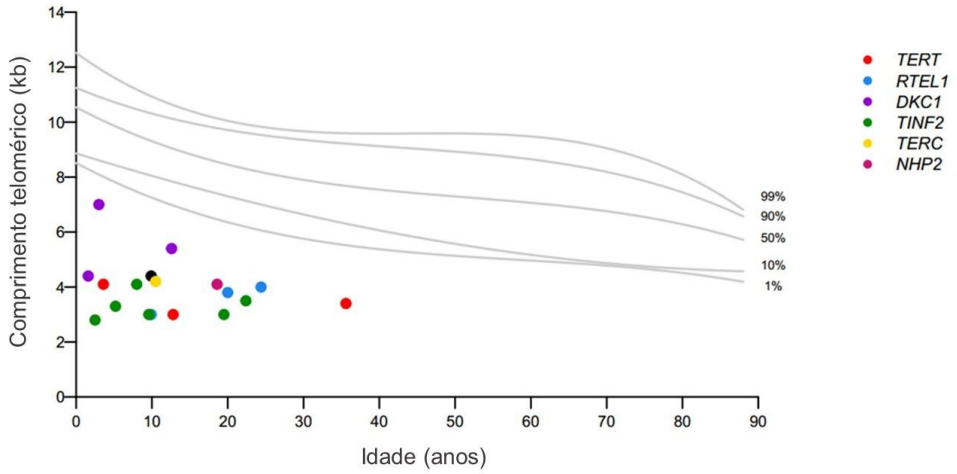


Figura 2 – Comprimento telomérico de pacientes com telomeropatia
Cada ponto no gráfico representa um paciente com telomeropatia (disceratose congênita), mutação em genes da biologia dos telômeros (*TERT, RTEL1, DKC1, TINF2, TERC* e *NHP2*) e comprimento telomérico curto, abaixo do 1º percentil para idade. Os percentis estão representados pelas curvas que foram modeladas com comprimentos teloméricos de um grupo de indivíduos saudáveis.

O protótipo de telomeropatia é a disceratose congênita (DC). Essa doença nominou a proteína discerina pelo fato de mutações em seu gene (*DKC1*) terem sido identificadas em pacientes com DC (HEISS et al., 1998). Além de *DKC1*, a DC já foi associada a mutações em *TERC*, *TERT*, *NOP10*, *NHP2*, *TINF2*, *TCAB1, RTEL1* e *PARN* (WALNE et al., 2010; VULLIAMY et al., 2011; BERTUCH, 2015). A DC é caracterizada por uma tríade de síntomas mucocutâneos (pigmentação reticulada da pele, distrofia ungueal e leucoplasia oral) com penetrância variável (CALADO; YOUNG, 2009a). Além dessas manifestações, a DC pode trazer consequências que afetam praticamente todos os sistemas do corpo, como a aplasia medular, a fibrose pulmonar, doenças hepáticas, anormalidades neurológicas e oftalmológicas (VULLIAMY et al., 2001; RUGGERO et al., 2003; SAVAGE; ALTER, 2010) (figura 3).

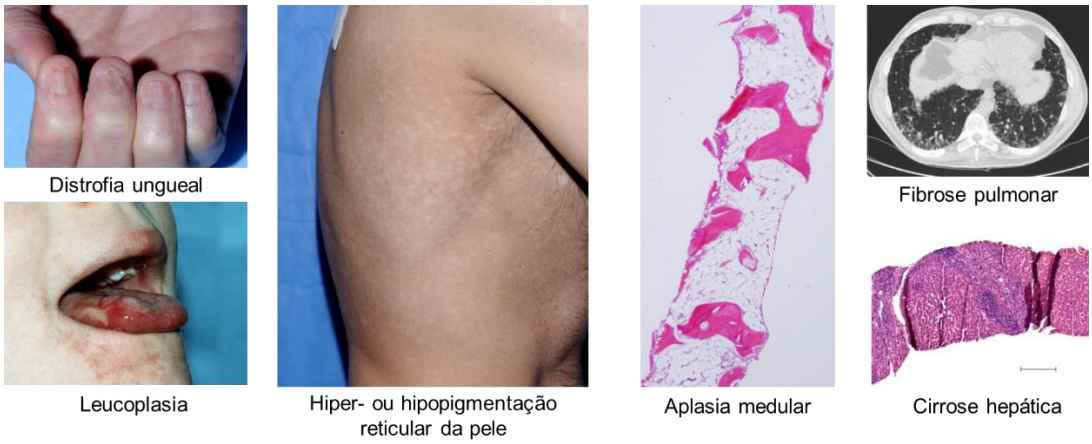


Figura 3 – Fenótipos da disceratose congênita
Adaptado de Calado e Young (2009).

Além de ser o fenótipo mais grave, com maior penetrância entre as telomeropatias, a DC é o segundo tipo mais comum de anemia aplástica (AA) congênita (PAIVA; CALADO, 2014). A AA caracteriza-se pelo comprometimento quantitativo e qualitativo (senescência e/ou apoptose) das CTHs na medula óssea que resulta em pancitopenia (YOUNG, 2006). Mais de 90% dos pacientes diagnosticados com DC evoluem com falência da medula óssea, a mais grave das complicações clínicas (KNIGHT et al., 1998; GRAMATGES; BERTUCH, 2013). Tal enfermidade, portanto, surge de replicações ineficientes das células progenitoras hematopoéticas, tendo como causa a acentuada erosão telomérica (figura 4). O transplante de medula óssea (TMO) ou terapias com hormônios sexuais são os tratamentos atualmente disponíveis para esses pacientes (TOWNSLEY et al., 2014).

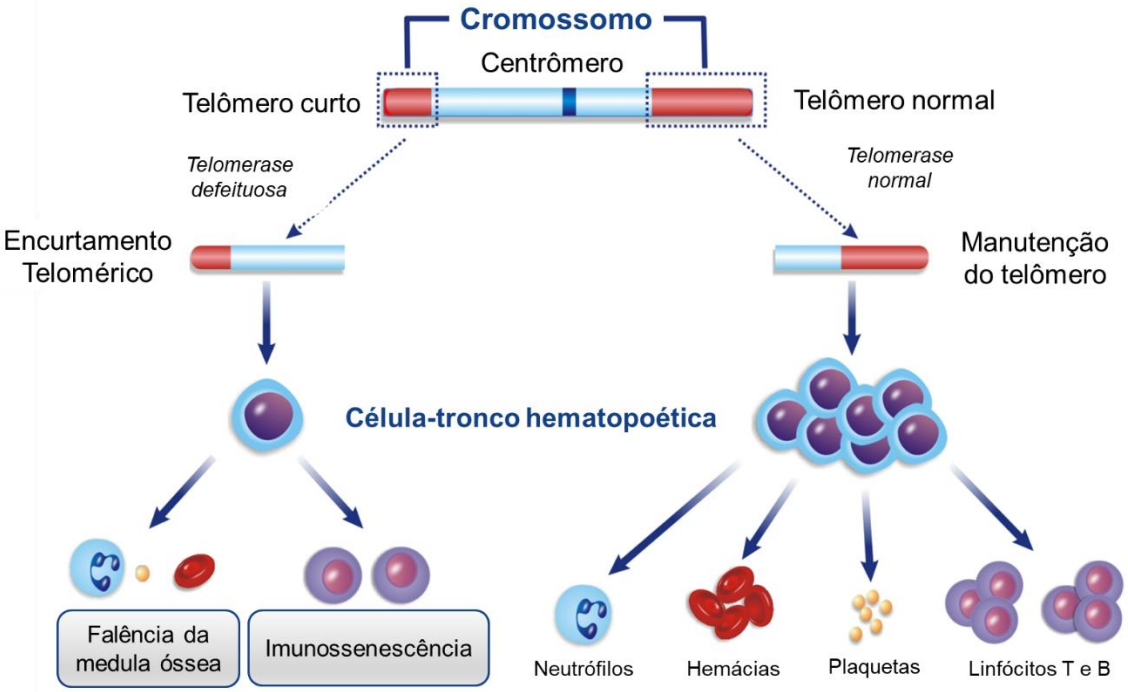


Figura 4 – Insuficiência medular causada por erosão telomérica
Adaptado de Paiva e Calado (2014).

Em torno de 20% dos pacientes com DC também apresenta FPI, na qual o tecido pulmonar se mostra irregularmente fibrótico e com inflamação intersticial, o que gera deficiência na troca gasosa e redução do volume do órgão, sendo geralmente a causa da morte de pacientes pós-TMO (DOKAL, 2000; CALADO, 2014). As doenças hepáticas também são complicações fatais da DC. A disfunção telomérica característica desses pacientes prejudica a regeneração dos hepatócitos, o que gera

fibrose, podendo evoluir para uma cirrose hepática e/ou hepatocarcinomas (CALADO; YOUNG, 2009; SUNAMI et al, 2014).

Há algum tempo já se sabe que a instabilidade citogenética causada pelo encurtamento telomérico aumenta a predisposição de pacientes com telomeropatias a desenvolverem cânceres. Recentemente, observou-se no sangue periférico de indivíduos com DC uma alta taxa de variantes somáticas (PERDIGONES et al., 2016). Essas variantes foram encontradas em genes associados a neoplasias hematológicas, o que caracteriza a hematopoese clonal (HC) (BUSQUE et al., 2012). Portanto, a HC potencializa a evolução para síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mieloide aguda (LMA) nos pacientes com telomeropatias.

1.3 Telômeros e mitocôndria

O fato das telomeropatias afetarem também tecidos com menor taxa proliferativa, como o hepático e o pulmonar, sugere que existem outros componentes celulares prejudicados. Suspeita-se que a disfunção telomérica possa afetar o funcionamento da mitocôndria explicando as manifestações patológicas no fígado e pulmão.

A mitocôndria é uma organela de dupla membrana conhecida por ser a “casa de força” da célula, onde é produzida a maior parte do ATP. Importantes reações bioquímicas ocorrem no seu interior, a exemplo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA, do inglês *tricarboxylic acid*), ou ciclo de Krebs, que transfere elétrons do piruvato, derivado da glicólise, para os carreadores NAD+ e FAD. Estes compostos reduzidos (NADH e $FADH_2$), por sua vez, são os substratos da fosforilação oxidativa (FOX ou OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*) que ocorre através da cadeia transportadora de elétrons (CTE). A CTE é composta de quatro complexos enzimáticos que estão localizados na membrana interna da mitocôndria, como mostra a figura 5.

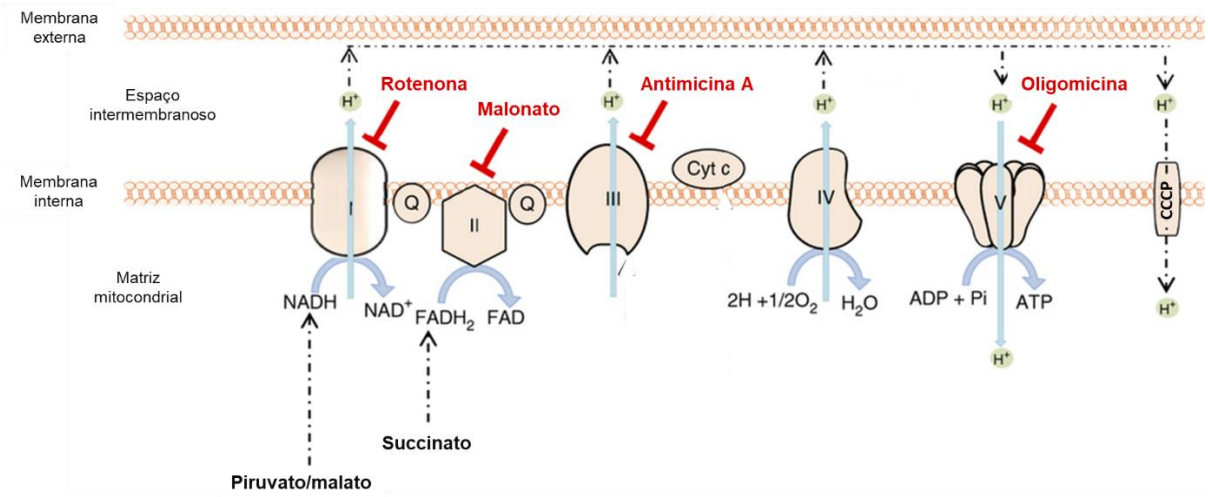


Figura 5 – Cadeia transportadora de elétrons
Adaptado de Salabei, Gibb e Hill (2014).

Na CTE, o NADH é oxidado pelo complexo I, e o complexo II oxida o $FADH_2$. Os elétrons são transferidos do complexo I e II para o complexo III, e deste para o complexo IV, onde o aceptor (O_2) é reduzido formando H_2O. O transporte de elétrons é acoplado ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, formando um gradiente de prótons. Em seguida, o gradiente é dissipado em direção à matriz mitocondrial, passando pela ATPsintase (complexo V) que converte este gradiente eletroquímico em síntese de ATP (NELSON; COX, 2008). Por meio destas reações (especificamente nos complexos I e III) são geradas as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MURPHY, 2009).

Esta organela tem seu DNA próprio, o DNA mitocondrial (mtDNA), que consiste em uma pequena molécula circular, de aproximadamente 16,5 kb, com centenas ou milhares de cópias por célula. Alterações na quantidade de mtDNA vem sendo associadas a implicações clínicas. A diminuição do número de cópias de mtDNA foi observada em diversas neoplasias (YU, 2011), doenças hepáticas (MORTEN et al., 2007), diabetes do tipo 2 (CHOI; KIM; PAK, 2001), miocardiopatias (BAI; WONG, 2005), entre outras. Embora menos comum, o aumento de mtDNA também foi relatado em alguns cânceres (YU, 2011). O mtDNA abriga genes que codificam 13 subunidades da CTE: sete subunidades do complexo I (entre estes estão os genes *ND1* e *ND2*); uma subunidade do complexo III; três subunidades do complexo IV; e duas subunidades do complexo V. Além disso, outros genes codificam dois RNAs ribossômicos e 22 RNAs transportadores, que juntos constituem a maquinaria de tradução das mitocôndrias (CHEN; BUTOW, 2005; WALLACE, 2010).

De maneira geral, a relação entre a biologia dos telômeros e o funcionamento mitocondrial vem sendo estabelecida por pelo menos três abordagem distintas. A primeira abordagem demonstra como as EROs induzem o encurtamento telomérico. Evidências indicam que as sequencias teloméricas são mais sensíveis a danos oxidativos (VON ZGLINICKI, 2002). Além disso, um estudo recente mostrou os efeitos inibitórios do dano oxidativo sobre a atividade da telomerase (FOUQUEREL et al., 2016). Dessa maneira, sob estresse oxidativo, há perda do comprimento telomérico e a telomerase é impedida de recuperar essa erosão.

Outra abordagem se baseia em estudos que afirmam que componentes do complexo da telomerase e do telossomo desempenham diretamente funções na mitocôndria. Santos e colaboradores (2004) afirmam que aminoácidos da extremidade N-terminal de TERT servem como um peptídeo-sinal direcionando a transcriptase reversa para a mitocôndria (GORDON; SANTOS, 2010). Uma vez na mitocôndria, TERT se liga aos genes *ND1* e *ND2*, melhorando a eficiência da cadeia respiratória, diminuindo a produção de EROs, protegendo contra apoptose e mantendo a integridade do mtDNA (SANTOS; MEYER; VAN HOUTEN, 2006; AHMED et al., 2008; HAENDELER et al., 2009; KOVALENKO et al., 2010). Maida et al (2009) demonstraram uma interação entre TERT e uma endorribonuclease na matriz mitocondrial formando um complexo para síntese de RNA naquela organela. Chen e colaboradores afirmam que a proteína TIN2, que compõe o telossomo, também desempenha funções na membrana interna da mitocôndria, regulando a sua forma e função (CHEN et al., 2012).

A terceira abordagem foi proposta por outro grupo que demonstrou como o encurtamento telomérico pode interferir na biogênese mitocondrial. Sahin e colabordores (2011) estabeleceram o eixo telômero-p53-PGC (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator*) como intermediador da relação entre disfunção telomérica e comprometimento mitocondrial. Segundo os autores, camundongos nocaute para *Tert* ou *Terc*, ao encurtarem seus telômeros, apresentam alta expressão de *TP53* que inibe a expressão de PGC-1α e PGC-1β (SAHIN et al., 2011). Os PGCs são reguladores mestres da fisiologia e biogênese mitocondrial. Com isso, a função mitocondrial é prejudicada, havendo diminuição da gliconeogênese e aumento na concentração de EROs. Os animais desenvolveram alterações não apenas em tecidos altamente proliferativos, mas também em órgãos predominantemente pós-mitóticos, a exemplo do coração (SAHIN et al., 2011), o que

pode melhor elucidar o acometimento de órgãos como fígado e pulmão nas telomeropatias.

Recentemente, nosso grupo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em colaboração com os *National Institutes of Health* (NIH, EUA), demonstrou que camundongos nocaute para o gene *Tert* apresentam hepatócitos com perfis metabólicos anormais (ALVES-PAIVA et al., 2017). Quando submetidos a uma dieta hipercalórica, os animais desenvolveram lesão nas células hepáticas com o acúmulo de gordura (esteatose), desregulação nas vias de sinalização da insulina, da fosforilação oxidativa e vias de biossíntese de ácidos graxos. O TCA se mostrou comprometido nessas células com depleção de aconitase e desbalanço nas razões NADPH/NADP+ e NADH/NAD+, indicando um perfil metabólico senescente.

O conjunto de evidências aqui apresentados, associado ao desconhecimento sobre o funcionamento mitocondrial em células de pacientes com telomeropatias e camundongos *Dkc1* hipomórficos, justificaram a realização deste trabalho.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros mitocondriais em tecidos de camundongos hipomórficos para o gene *Dkc1* (Dkc1^{m}) e células primárias de pacientes diagnosticados com telomeropatias, a fim de compreender o impacto do encurtamento telomérico no funcionamento mitocondrial.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o funcionamento da cadeia respiratória dos tecidos hepático, pulmonar e hematopoético de camundongos Dkc1^{m};
- Avaliar o funcionamento da cadeia respiratória de fibroblastos primários de pacientes com telomeropatias;
- Quantificar o número de cópias de DNA mitocondrial em fibroblastos primários e em leucócitos de sangue periférico de pacientes com telomeropatias;
- Quantificar a massa mitocondrial de fibroblastos primários de pacientes com telomeropatias;
- Quantificar a produção de superóxido (precursor das EROs mitocondriais) em fibroblastos de pacientes com telomeropatias;
- Analisar a expressão diferencial de genes associados à biogênese e função mitocondrial em fibroblastos primários de pacientes com telomeropatias;
- Comparar o número e a frequência alélica de variantes somáticas de pacientes com anemia aplástica com telômeros curtos e normais.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e métodos

A figura 6 (A e B) resume as principais metodologias e modelos utilizados no estudo. Foram realizados experimentos em modelos murinos (*in vivo*) e células primárias de pacientes e controles (*in vitro*).

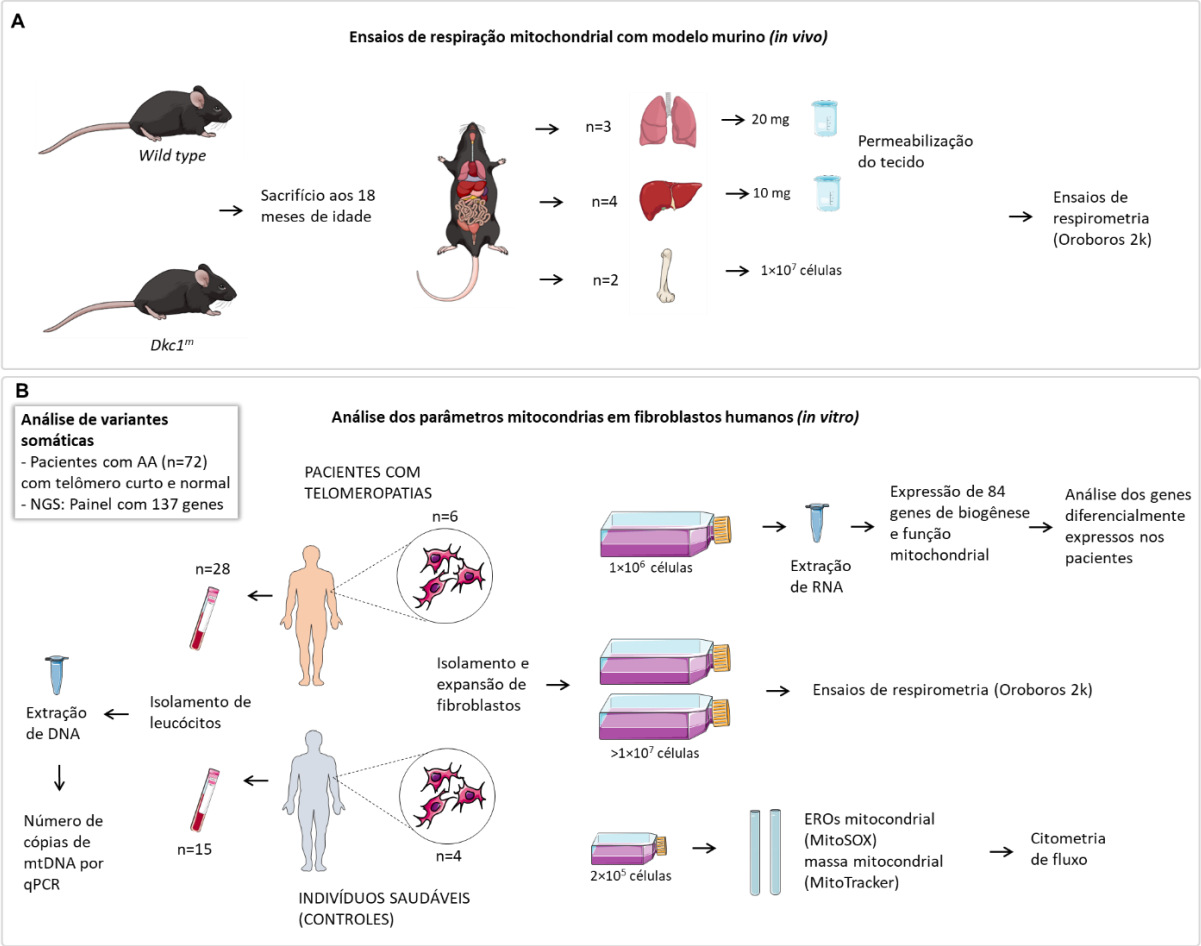


Figura 6 – Representação esquemática dos ensaios realizados no estudo
(A) A primeira etapa do estudo foi realizada num modelo *in vivo* de camundongos *Dkc1* hipomórficos (Dkc1^m) (n=9) e selvagens (*wild type*) (n=9). Foram feitos ensaios de respirometria no tecido pulmonar, hepático e em células da medula óssea. **(B)** Na segunda etapa do trabalho, foi realizada quantificação do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) de sangue periférico de pacientes não aparentados com telômero curto e mutação nos genes da biologia dos telômeros, comparando com indivíduos saudáveis (controles). Fibroblastos de pacientes (n=6) e controles (n=4) foram coletados para realização dos ensaios de expressão gênica, respitometria, quantificação de EROs (espécies reativas de oxigênio) e massa mitocondrial. Por fim foi feita a análise genética dos pacientes com anemia aplástica (AA) com telômeros curto e normal, usando um painel de 137 genes por sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*). Figuras adaptadas do banco de imagens do *Les Laboratoires Servier* (https://smart.servier.com).

3.1 Modelo murino

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos *Dkc1* hipomórficos (Dkc1^m) (n=9), bem como os selvagens (Wt, do inglês *wild type*) (n=9), mantidos em

gaiolas mini-isoladoras, sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro), no Biotério do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Ao atingirem 18 meses de vida, foram sacrificados em câmara de CO_2 e posteriormente submetidos a um deslocamento cervical. Não foram administrados anestésicos, como tiopental, visto que drogas como estas interagem com as mitocôndrias, afetando sua estrutura e/ou prejudicando o funcionamento da cadeia respiratória com a diminuição da produção de ATP (MONACA; FODALE, 2012). Após o sacrifício, cada animal foi colocado em decúbito dorsal e foram retirados o fígado, os pulmões ou os fêmures (para coletar células da medula óssea). O presente trabalho teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da FMRP-USP registrado com o número 142/2016 (anexo 1).

3.2 Coleta de sangue periférico e extração de DNA

Foram coletadas amostras de sangue periférico (4 mL) de pacientes com anemia aplástica adquirida e congênita (disceratose congênita) (n=72) de ambos os sexos, com idades variadas, telômeros curtos (<10º percentil) ou normais (apêndice A). Todos os pacientes são acompanhados pelos serviços de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Amostras de sangue periférico (4 mL) também foram coletadas de indivíduos saudáveis (controles, n=15) de ambos os sexos, com idades variadas, sem histórico de doenças hematológicas e com comprimento telomérico normal (apêndice B). A coleta foi feita somente após a concordância dos indivíduos por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP (nº 3407/2016) (anexo 2).

Leucócitos totais foram isolados das amostras de sangue periférico para extração de DNA. O DNA total foi extraído com a utilização do kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (*Qiagen*), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação foi feita no Qubit 3.0 (*Thermo Fisher Scientific*), as razões 260/280 e 260/230 foram observadas no nano-espectrofotômetro *DeNovix* e a integridade do DNA foi verificada em gel de 0,8% agarose. As amostra de DNA que passaram pelos critérios de qualidade (razões 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,1, e banda única no gel) foram utilizadas no sequenciamento e na quantificação do número de cópias de DNA mitocondrial.

3.3 Coleta e cultivo dos fibroblastos

Utilizamos fibroblastos dermais de pacientes e controles armazenados no biorrepositório ligado ao projeto da MSc Maria Florencia Tellechea, aprovado pelo CEP do HC-FMRP-USP sob o número 6212/2014. Os fibroblastos foram coletados da região interna do braço por meio de uma biópsia por *punch*, com anestesia local. A coleta foi realizada somente após a assinatura do TCLE. Os indivíduos foram convidados a assinar um novo TCLE referente a este estudo que também passou pela aprovação de CEP do HC-FMRP-USP (nº 3407/2016) (anexo 2).

Foram usados fibroblastos de seis pacientes com telômeros curtos para a idade (<10º percentil) atendidos no ambulatório de Falência Medular do HC-FMRP-USP e quatro indivíduos saudáveis que também se voluntariaram a se submeter a uma biópsia de pele (tabela 1). Os fibroblastos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *low glucose* (Sigma) com 10% de soro bovino fetal (SBF, *Gibco*) e incubados a 37°C, 5% de CO_2. Substituímos o meio padrão por DMEM 0,5% SBF 24 horas antes dos experimentos, pois o soro interfere nos ensaios de respiração mitocondrial.

Tabela 1 - Características clínicas dos doadores de fibroblastos

ID	Gene (alteração na proteína ou no RNA)	Idade (anos)	Comprimento telomérico médio dos leucócitos	Manifestação clínica
Ctrl1	-	28	Normal	Clinicamente saudável
Ctrl2	-	29	Normal	Clinicamente saudável
Ctrl3	-	24	Normal	Clinicamente saudável
Ctrl4	-	30	Normal	Clinicamente saudável
Pac1	*TERC* (r.94 C>T) e *TERT* (p.V777M)	18	<1º percentil	Disceratose congênita
Pac2	*TERC* (r.94 C>T) e *TERT* (p.V777M)	52	<10º percentil	Hepatopatia
Pac3	*RTEL1* (p.C1086Y e p.A1259fs)	14	<1º percentil	Disceratose congênita
Pac4	*DKC1* (p.A353V)	3	<1º percentil	Disceratose congênita
Pac5	*RTEL1* (p.R743*)	51	<10º percentil	Fibrose pulmonar
Pac6	*POT1* (p.P146L)	28	<10º percentil	Anemia aplástica

Adicionalmente, realizamos ensaios utilizando as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) derivadas a partir da reprogramação dos fibroblastos. A pós-doutoranda Lílian Figueiredo (processo FAPESP nº 2015/15225-3) reprogramou, por meio de transfecção de vetores epissomais, os fibroblastos de Pac1 e Ctrl1, gerando iPSCs que foram cultivadas em meio E8 com 10 µM de inibidor da proteína cinase associada a Rho, ROCK (Gibco), mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO_2, até o momento do experimento.

3.4 Ensaios de respirometria de alta resolução

Usamos o oxígrafo Oroboros (*Oxygraph-2k*, *Oroboros Instruments*) com o objetivo de analisar a respiração mitocondrial. O *Oroboros* mede o consumo de oxigênio numa câmara de 2,1 mL hermeticamente fechada, com temperatura controlada (37ºC) e equipada com um agitador magnético. Nesse ensaio, podem ser utilizadas biópsias de tecido e células isoladas, permeabilizadas ou não.

Utilizamos o protocolo CCP (do inglês, *coupling control protocols*) para ensaios com células intactas (não permeabilizadas). Com esse protocolo, avalia-se: (1) a respiração basal (*routine*, do inglês); (2) o consumo de oxigênio sem a síntese de ATP (*leak*), por meio da adição de oligomicina, um inibidor da ATP sintase; (3) a capacidade máxima de transporte de elétrons (ETS, do inglês *electron transfer system*), estimulada pela adição de um desacoplador (CCCP, carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona); e, por fim, (4) inibe-se o consumo de oxigênio mitocondrial com a adição de antimicina A, um inibidor do complexo III da cadeia respiratória (figura 7).

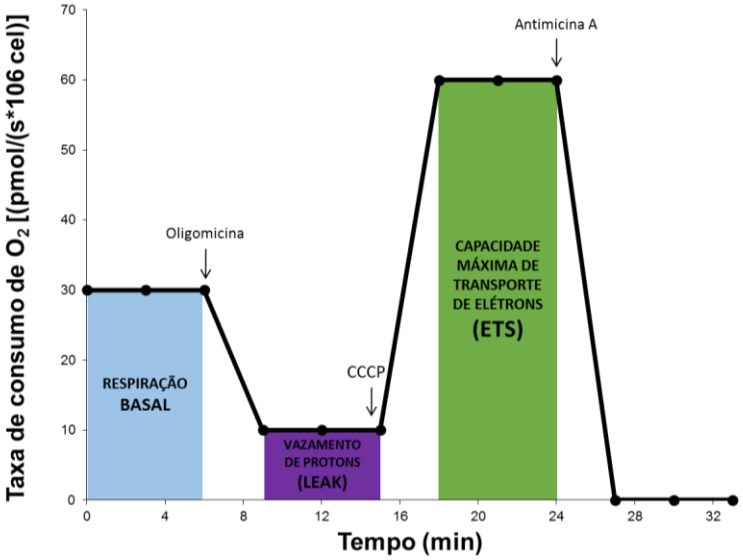


Figura 7 – Representação do ensaio de respirometria com células intactas
Gráfico representativo de um ensaio de respirometria de alta resolução com células intactas (não permeabilizadas). Os platôs indicam diferentes estágios de respiração. O primeiro (azul) representa a média da respiração basal. O segundo platô (roxo) se refere à respiração por vazamento de prótons (LEAK), quando se inibe a ATP sintase por meio da oligomicina. O CCCP é um desacoplador mitocondrial que permite analisar a capacidade máxima de transporte de elétrons (ETS), como mostra o último platô (verde). Para finalizar, adiciona-se a antimicina A, um inibidor do complexo III que bloqueia a respiração mitocondrial. Esse traçado foi usado nos ensaios com células da medula óssea de camundongos, nos fibroblastos humanos e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs).

No momento do experimento, os fibroblastos foram individualizados com tripsina (0,05%), lavados em 1× PBS, contados e ressuspendidos em 2 mL de meio

de respiração (MiR05), numa concentração de pelo menos 1×10^6 células/mL. As iPSCs foram dissociadas com *Accutase*, lavadas em 1× PBS e ressuspendida em 2 mL de meio RPMI sem vermelho de fenol, numa concentração de pelo menos 2×10^6 células/mL. As células da medula óssea dos camundongos foram coletadas dos fêmures pela inserção de uma seringa na cavidade do osso, lavando-a com 2 mL de RPMI.

Outros dois traçados foram padronizados para tecido hepático (figura 8) e pulmonar (figura 9) de camundongo. O objetivo foi utilizar o mesmo traçado para analisar o funcionamento dos complexos I e II da cadeia respiratória em tecidos permeabilizados. Foram utilizados cerca de 10 mg do tecido hepático e 20 mg do pulmonar para cada experimento. Após serem seccionados, os tecidos foram colocados em meio de preservação (Biops) e foram permeabilizados com adição de saponina, incubando por 5 min. Em seguida, transferiu-se cada tecido para as câmaras do equipamento onde ficaram submersos em meio de respiração mitocondrial (MiR05), sob agitação.

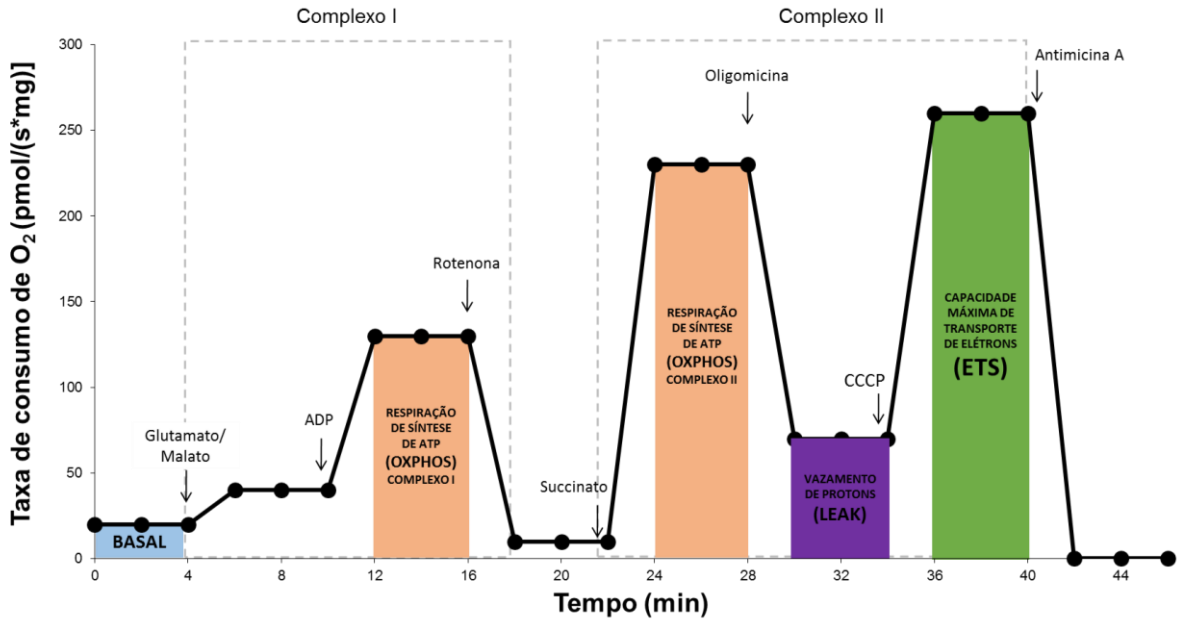


Figura 8 – Representação do ensaio de respirometria com tecido hepático
Gráfico representativo do ensaio de respirometria de alta resolução com tecido hepático permeabilizado de camundongo. Os platôs indicam diferentes estágios de respiração mediados por estímulos como adição de substratos (glutamato/malato e succinato), ADP, rotenona (inibidor do complexo I), oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial) e antimicina A (inibidor do complexo III). Os substratos glutamato/malato geram NADH que transferem os seus elétrons para complexo I, enquanto o succinato gera FADH que entram na cadeia respiratória via complexo II.

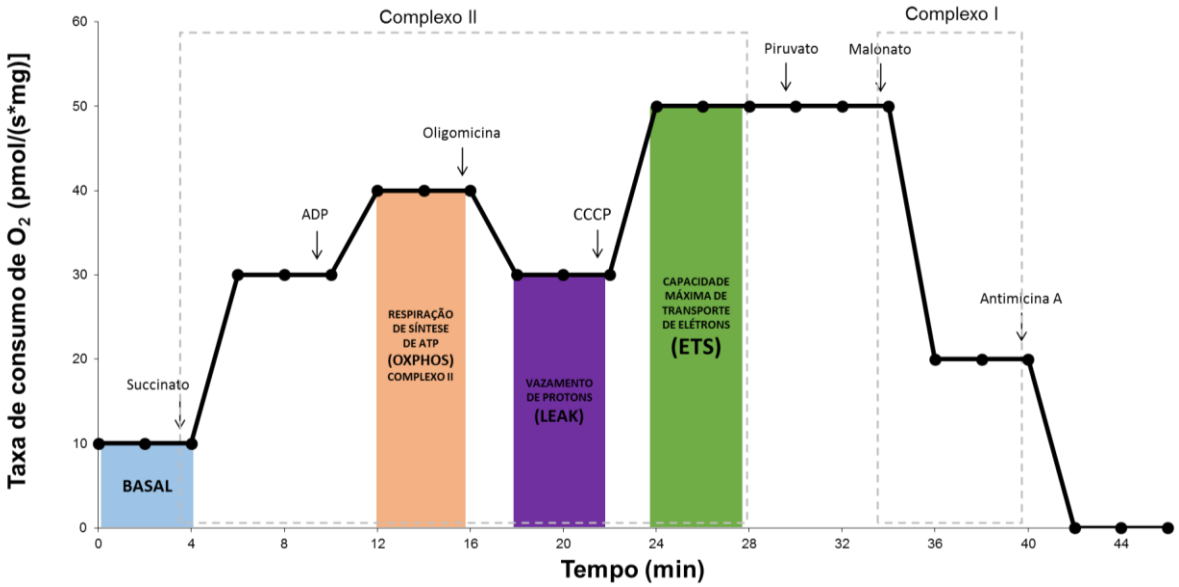


Figura 9 – Representação do ensaio de respirometria com tecido pulmonar
Gráfico representativo do ensaio de respirometria de alta resolução com tecido pulmonar permeabilizado de camundongo. Os platôs indicam diferentes estágios de respiração mediados por estímulos como adição de substratos (succinato e piruvato), ADP, oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial), malonato (inbidor do complexo II) e antimicina A (inibidor do complexo III). O succinato gera $FADH_2$ que entram na cadeia respiratória via complexo II e o piruvato gera NADH que transfere elétrons para o complexo I.

Os valores médios de cada platô foram extraídos por meio do programa DataLab (versão 5.1.0.20) desenvolvido pelo fabricante do equipamento. Foi empregado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (teste U) para comparar os valores médios associados aos grupos. As análises estatísticas foram feitas no *GraphPad Prism* (versão *4 Prism, GraphPad, USA*).

3.5 Quantificação da produção de ERO e da massa mitocondrial

A produção de ERO mitocondrial foi determinada utilizando 5 µM da sonda *MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (Molecular Probes*) que oxida na presença de superóxido produzindo uma fluorescência vermelha. O superóxido é o precursor dos EROs mitocondriais. No mesmo ensaio foi usado 100 nM do marcador de mitocôndria *MitoTracker Deep Red FM* para quantificar a massa mitocondrial. Foram usados fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=4) e pacientes (n=6) em passagens semelhantes (p6 e p7). Foram incubadas 5×10^4 células a 37ºC por 10 minutos numa solução de 1× PBS, 5 mM de *MitoSOX* e 100 nM de *MitoTracker*. Em seguidas, as células foram lavadas e ressuspendidas em 1× PBS para a aquisição da fluorescência no citômetro de fluxo (*FACSCanto II da BD Biosciences*). Foram

adquiridos 10.000 eventos por amostra. A florescência emitida pela sonda *MitoSOX* foi lida no canal do PE e a sonda *MitoTracker* no canal do APC. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à produção de superóxido (precursor dos EROs mitocondriais) e à massa mitocondrial. Os valores de fluorescência foram obtidos através do *software FlowJo* V10. Foi empregado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (teste U) para comparar os valores médios associados aos grupos. As análises estatísticas foram feitas através do programa *GraphPad Prism* (versão *4 Prism, GraphPad, USA*).

3.6 Número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA)

A quantificação do número de cópias de mtDNA foi feita por PCR em tempo real (*PCR System ABI 7500*) em dois ensaios separados, um amplificando um gene nuclear e outro um gene mitocondrial. Em cada reação, foram adicionados 2 µL de DNA (20 ng/µL), 10 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Qiagen*), 6 µL de H_2O e 1 µL de cada *primer* (10 nM) *forward* e *reverse* (tabela 2). Para a mesma amostra foram utilizados *primers* para o gene mitocondrial (*MTCYB*) e *primers* para o gene nuclear de cópia única (*PK1*), em poços diferentes. Cada amostra foi amplificada em triplicata, com as seguintes condições: 95ºC por 10 min, 30 ciclos de 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 min. O número de cópias de mtDNA para cada amostra foi determinado usando o método $2^{[-\Delta Ct\ (Ct(gene\ mitocondrial)-Ct(gene\ nuclear)]}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Sequências de *primers* para quantificação de DNA mitocondrial

Genes alvo	*Primer Forward* 5′–3′	*Primer Reverse* 5′–3′
MTCYB (mitocondrial)	CACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC	TGATCCCGTTTCGTGCAAG
PK1 (nuclear)	AGCCCAAATGGCCTTGAA	AGAGACAGAATGCCAGTGAGC

Foi empregado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (teste U) para comparar os valores médios associados aos grupos. Para as análises de correlação, utilizamos coeficiente de Spearman (r) por ser o modelo que melhor representava a distribuição dos dados. As análises estatísticas foram feitas através do programa *GraphPad Prism* (versão *4 Prism, GraphPad, USA*).

3.7 Avaliação do comprimento telomérico

Para medir comprimento telomérico das células do sangue periférico dos controles e pacientes, foi utilizada a técnica do *Flow-FISH*, de acordo com o protocolo estabelecido em nosso laboratório (GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014). O *Flow-FISH* utiliza uma sonda composta de peptídeo de ácido nucléico (PNA) (CCCTAAA) telômero-específica, conjugada a um marcador fluorescente (FITC), que se hibridiza de maneira quantitativa às repetições teloméricas. Foi utilizado o kit comercial *Telomere PNA kit/FITC* (*Dako*). As amostras foram processadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (*BD Biosciences*) e através do *software FlowJo* extraímos a intensidade média de fluorescência que foi transformada em kb. Foram estabelecidos percentis a partir de uma curva modelada por comprimentos teloméricos de indivíduos saudáveis por idade (figura 2). Telômeros abaixo do 10º percentil foram considerados curtos.

Para mensurar os telômeros dos animais, foram feitos dois ensaios de PCR quantitativa, um utilizando *primers* para os telômeros *forward* (5'-CGGTTTG TTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3') e *reverse* (5'-GGCTTGCCTC CTTACTACCCTCCTTACTACCCTCCTTAC-3') e outro utilizando *primers* para o gene 36B4 *forward* (5'-ACTGGTCTAGGAGAGAAGCCC-3') e *reverse* (5'-TCAATGGTGC CTCTGGAGATT-3'), gene de cópia única em camundongos, como normalizador. A primeira reação foi feita com 20 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Qiagen*), 20 ng de DNA genômico e 300 nM de cada *primer* telomérico, submetidas às seguintes condições: 95ºC durante 10 min, seguido por 30 ciclos de 95ºC por 15 segundos e 56ºC por 1 min. A segunda PCR continha 20 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Qiagen*), 20 ng de DNA, 300 nM do *primer forward* e 500 nM do *primer reverse* do 36B4. As condições da reação foram: 95ºC durante 10 min, seguido por 35 ciclos de 95ºC por 15 segundos, 52ºC durante 20 segundos e 72ºC por 30 segundos. As reações foram feitas no equipamento Rotor Gene (*Qiagen*).

O comprimento do telômero para cada amostra foi determinado usando a razão do telômeros pelo gene de cópia única (razão: T/S) com o cálculo do ΔC_t [$C_t^{(\text{telômero})}/C_t^{(\textit{single gene})}$]. Foi empregado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (teste U) para comparar os valores médios associados aos grupos. As análises foram feitas através do programa *GraphPad Prism* (versão *4 Prism, GraphPad, USA*).

3.8 Extração de RNA, preparo do cDNA e PCR em tempo real

A extração de RNA total foi feita com o *RNeasy Plus Mini kit (Qiagen)*, a partir de um *pellet* de 1×10^6 fibroblastos, seguindo as recomendações do fabricante. Todo o preparo do cDNA foi feito com o *RT² First Strand Kit*. Na primeira etapa, eliminou-se resquícios de DNA genômico utilizando o *Buffer GE* em 0,5 µg de RNA, incubando por 5 min a 42°C, seguido de 1 min no gelo. A partir dessa purificação, o cDNA foi sintetizado usando a transcriptase reversa do kit (*RE3*) submetida a 42°C por 15 min e 95°C por 5 min.

Para os ensaios de PCR em tempo real, foi feita uma mistura de cDNA, *RT² SYBR Green Mastermix* e H_2O e distribuídos 25 µL em cada poço da placa *RT² Profiler PCR Array (96-Well Format) Human Mitochondria (PAHS-087ZA)*, contendo 84 genes de biogênese e função mitocondrial. A reação foi feita no equipamento *Applied Biosystems 7500* usando um programa de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Os dados foram analisados na plataforma *GeneGlobe* da *Qiagen* (https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/).

3.9 Sequenciamento de nova geração

Com objetivo de correlacionarmos os resultados da produção de ERO à frequência de variantes somáticas em pacientes com telômeros curtos, reanalisamos os dados sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*) de 72 pacientes com anemia aplástica adquiridas e congênita (disceratose congênita), com telômeros curtos (<10º percentil) e normais. Esse sequenciamento foi financiado com recursos do regular FAPESP (2016/12799-1).

O NGS foi realizado em três etapas: o preparo das bibliotecas, o sequenciamento massivo em paralelo e a análise dos dados.

3.9.1 Preparo das bibliotecas

O DNA genômico de cada paciente (50 ng) foi fragmentado enzimaticamente em sequências de cerca de 150 pares de bases. Adaptadores foram adicionados às extremidades dos fragmentos que foram purificados com *beads* magnéticas *AMPure XP Beads (Agencourt)*. O DNA fragmentado foi hibridado com a biblioteca de captura alvo-específica contendo sondas de RNA complementares aos genes de interesse. As moléculas hibridizadas foram capturadas e amplificadas por PCR com a finalidade

de enriquecer os fragmentos da biblioteca gerada. Por fim, uma sequência específica (*barcode* ou índice) foi adicionada aos fragmentos amplificados de cada paciente, servindo como identificador único que viabiliza a identificação e separação das amostras na análise *in silico*, após o sequenciamento massivo em paralelo. Foram preparadas 72 bibliotecas, uma para cada paciente a ser sequenciado. Cada biblioteca foi quantificada por fluorimetria e qualificada por eletroforese automatizada.

As bibliotecas foram preparadas utilizando o kit de captura *SureSelect QXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library* (*Agilent Technologies*). Para essa trabalho, utilizamos um painel de genes personalizado e desenhado pelo nosso grupo de pesquisa para identificar variantes germinativas e somáticas em 137 genes associados a telomeropatias, falências de medula óssea e neoplasias hematológicas (tabela 3).

Tabela 3 – Painel gênico
Total de 137 genes que compõem o painel personalizado para a investigação de variantes genéticas de pacientes com suspeita de telomeropatias.

ABL1	*CDAN1*	*FANCD2*	*JAK1*	*PARN*	*RPS17*	*STAT3*
ASXL1	*CDKN2A*	*FANCE*	*JAK2*	*PCNA*	*RPS19*	*TCP1*
ATM	*CEBPA*	*FANCF*	*JAK3*	*PDGFRA*	*RPS24*	*TEN1*
ATRX	*CSF3R*	*FANCG*	*KDM6A*	*PEG3*	*RPS26*	*TERC*
BCOR	*CTC1*	*FANCI*	*KIT*	*PHF6*	*RPS7*	*TERF1*
BCORL1	*CUX1*	*FANCL*	*KMT2A*	*PIF1*	*RTEL1*	*TERF2*
BRAF	*DAXX*	*FANCM*	*KRAS*	*PIGA*	*RUNX1*	*TERT*
BRCA2	*DCLRE1B*	*FBXW7*	*MPL*	*PML*	*RUVBL1*	*TET2*
BRIP1	*DDX41*	*FLT3*	*MRE11A*	*POT1*	*RUVBL2*	*TGS1*
CALR	*DHX36*	*G6PC3*	*MYC*	*PRF1*	*SBDS*	*THPO*
CBL	*DIDO1*	*GATA1*	*MYD88*	*PTEN*	*SETBP1*	*TINF2*
CBLB	*DKC1*	*GATA2*	*NAF1*	*PTGES3*	*SF3B1*	*TP53*
CBLC	*DNMT3A*	*GFI1*	*NBN*	*PTPN11*	*SH2B3*	*TPP1*
CCT2	*ELANE*	*GNAS*	*NHP2*	*RAD21*	*SHQ1*	*U2AF1*
CCT3	*ETV6*	*HAX1*	*NOP10*	*RAD51C*	*SLX4*	*U2AF2*
CCT4	*EZH1*	*HRAS*	*NOTCH1*	*RPL11*	*SMC1A*	*WAS*
CCT5	*EZH2*	*IDH1*	*NPM1*	*RPL15*	*SMC3*	*WRAP53*
CCT6A	*FANCA*	*IDH2*	*NRAS*	*RPL35A*	*SRP72*	
CCT7	*FANCB*	*IKZF1*	*OBFC1*	*RPL5*	*SRSF2*	
CCT8	*FANCC*	*IRF1*	*PALB2*	*RPS10*	*STAG2*	

3.9.2 Sequenciamento massivo em paralelo

O sequenciamento massivo em paralelo das bibliotecas foi realizado na plataforma *NextSeq 500 (Illumina)* pelos métodos de "*Bridge PCR*" e "SBS"

(*Sequencing-by-Synthesis*), *utilizando o NextSeq 500/550 High Output Kit v2* para 300 ciclos (Illumina).

3.9.3 Análise e filtragem de variantes

Os *softwares* do sequenciador geraram arquivos FASTQ removendo adaptadores e índices. As *reads* contidas nos FASTQ foram mapeadas usando o genoma de referência (GRCh37/hg19) com o algoritmo BWA-MEM do programa BWA (*Burrows-Wheeler transform*) (LI; DURBIN, 2009). O mapeamento gerou arquivos SAM que foram convertidos ao formato binário (BAM), usando o *SamFormatConverter*, ferramenta do Picard. As *reads* alinhadas foram examinadas com o algoritmo *MarkDuplicates* (Picard) para identificar duplicatas moleculares, quando houve diferentes *reads* mapeadas exatamente nas mesmas coordenadas genômicas. As duplicatas detectadas foram sinalizadas nos arquivos BAM.

A maioria dos alinhadores de *short reads* mapeiam cada *read* independentemente, o que pode gerar falsas inserções ou deleções (*indels*). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção desse tipo de variante, foi feito um realinhamento local nas regiões com possíveis *indels*. Utilizou-se o *IndelRealigner*, ferramentas do GATK (*Genome Analysis Tool Kit*), para realizar esse realinhamento em torno dos locais de candidatos a *indels*. Portanto, esta etapa corrigiu os erros de posicionamento, diminuindo a taxa falsos-positivos *indels* e SNVs (do inglês, *single nucleotide variant*).

Cada nucleotídeo sequenciado foi associado a um escore de qualidade que indica a probabilidade da base estar errada (*Phred-like Q score*). Utilizamos uma ferramenta do GATK para recalibrar esses escores de qualidade depois do realinhamento. O *software* recalculou os Q escores com base no escore de qualidade originalmente relatado, na posição do nucleotídeo na *read*, e no nucleotídeo anterior e posterior. Após a recalibração, os arquivos inicialmente gerados nas 4 *lanes* foram agregados, formando um único BAM por amostra, através do *samtools-merge*.

Os arquivos BAM de cada amostra foram usados como entrada nos *softwares Mutect2* e VarDict, que realizaram a chamada de variantes somáticas (SNVs e *indels*). Por fim, foram gerados arquivos VCF (*variant calling file*), com a posição de todas as variantes. O VCF foi usado no *software* ANNOVAR (YANG; WANG, 2015) para fazer a anotação das variantes, gerando a tabela de variantes somáticas que foram filtradas seguindo os critérios descritos abaixo (adaptado de YOSHIZATO et al., 2015).

Critérios de inclusão para variantes somáticas:

- ✓ Qualidade de mapeamento ≥ 25;
- ✓ Qualidade da base ≥ 15;
- ✓ Número de SNVs na mesma *read* < 5;
- ✓ Número de inserções e deleções na mesma *read* < 2;
- ✓ Número total de *reads* ≥ 10;
- ✓ Número de variante por *reads* ≥ 5;
- ✓ Frequência alélica da variante na amostra ≥ 0,02 e < 0,39
- ✓ Variante registrada no COSMIC v67 com frequência alélica da variante (VAF, do inglês, *variant allele frequency*) > 0,02.

Critérios de exclusão de variantes somáticas:

- ✓ Variantes sinônimas, intergênicas, intrônicas, *upstream*, *downstream*, 5'UTR, 3'UTR e ambíguas (desconhecidas);
- ✓ SNVs que forem registrados em bancos de dados públicos (*gnomAD* e *ESP*) e privados com uma frequência populacional ≥ 0,01 (polimorfismo);
- ✓ Variantes encontradas em apenas uma direção;
- ✓ Variantes consideradas erros na inspeção visual pelo IGV (*Integrative Genomics Viewer*);
- ✓ Variantes recorrentes que estiverem fracamente associadas às doenças;
- ✓ *Indels* de pelo menos quatro nucleotídeos que foram observados em várias amostras.

Com as variantes filtradas, foram elaborados gráficos (*violin plot* e *box plot*) usando o pacote *ggplot2* no *RStudio* (versão 3.4.3).

4 Resultados

4.1 Não há diferença entre a respiração mitocondrial dos animais do grupo controle (Wt) e *Dkc1* hipomórfico (Dkc1^{m})

No ensaio de respirometria com tecido hepático, observamos que não há diferença entre os grupos controle (Wt) e *Dkc1* hipomórfico (Dkc1^{m}) em nenhum dos estágios da respiração (figura 10).

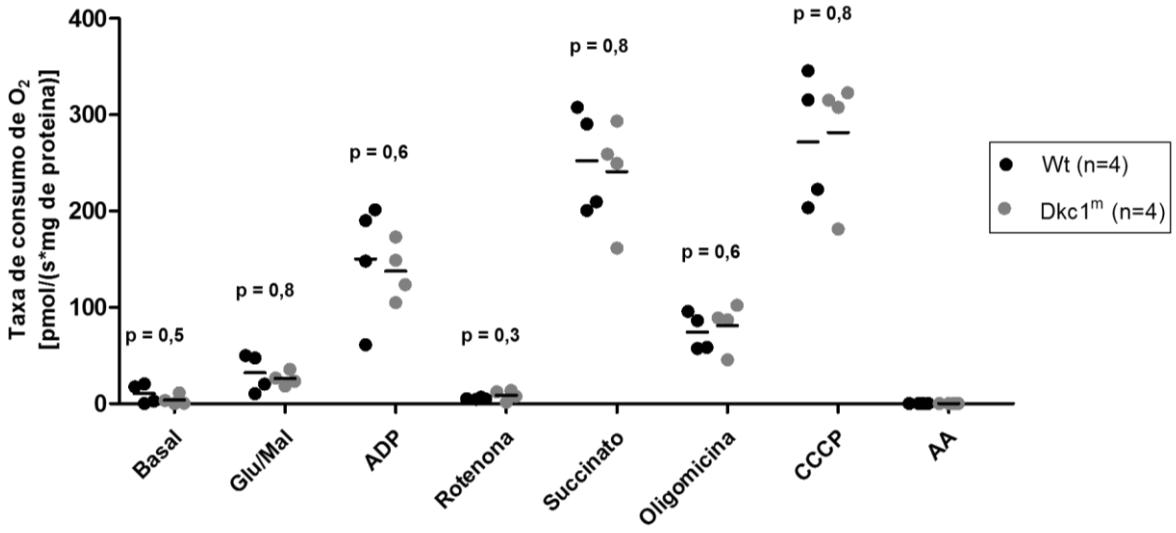


Figura 10 – Respirometria com tecido hepático de camundongos
Ensaio de respirometria de alta resolução com tecido hepático permeabilizado de camundongo. Cada ponto no gráfico indica uma média da taxa de respiração do tecido de um animal no momento em que foram adicionados substratos (glutamato/malato e succinato), ADP, rotenona (inibidor do complexo I), oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial) e antimicina A (inibidor do complexo III). Foram utilizados quatro animais controles (Wt) e quatro *Dkc1* hipomórficos (Dkc1^m), em jejum de pelo menos 12 horas.

Também não houve diferença no tecido pulmonar entre os animais Wt e Dkc1^m em nenhum dos estágios da respiração observados (figura 11), corroborando o que vimos no tecido hepático.

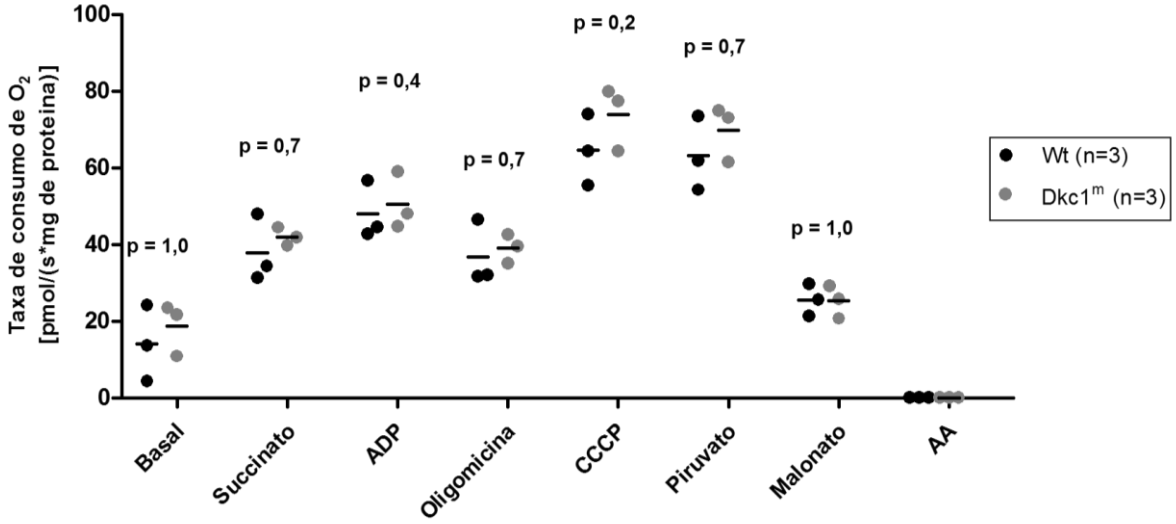


Figura 11 – Respirometria com tecido pulmonar de camundongos
Ensaio de respirometria de alta resolução com tecido pulmonar permeabilizado de camundongo. Cada ponto no gráfico indica uma média da taxa de respiração do tecido de um animal no momento em que foram adicionados substratos (succinato e piruvato), ADP, oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial), malonato (inibidor do complexo II), e antimicina A (inibidor do complexo III). Foram utilizados três animais controles (Wt) e três *Dkc1* hipomórficos (Dkc1^m), em jejum de pelo menos 12 horas.

Para analisarmos a respiração das células da medula óssea dos camundongos, usamos o protocolo para células intactas (oligomicina, CCCP e antimicina A) (figura

12). Ao observarmos que não havia diferença entre a respiração dos Wt (n=2) e dos Dkc1^m (n=2) julgamos não ser necessário sacrifício de outros animais. Segundo dados não publicados da Dra Raquel Alves-Paiva, esses animais não apresentam diferença na produção de células sanguíneas (processo FAPESP 2011/18313-0).

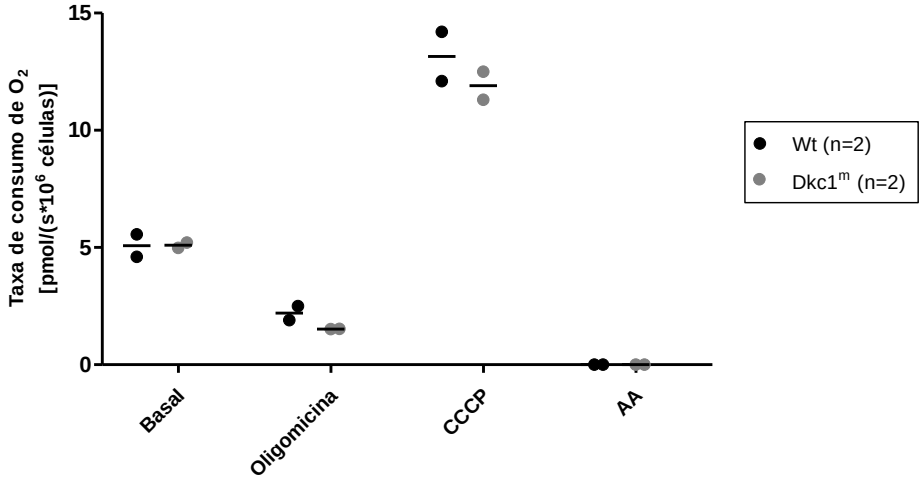


Figura 12 – Respirometria com medula óssea de camundongos
Ensaio de respirometria de alta resolução com célula da medula óssea de camundongos. Cada ponto no gráfico indica uma média da taxa de respiração das células de um animal no momento em que foram adicionados oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial) e antimicina A (inibidor do complexo III). Foram utilizados dois animais controles (Wt) e dois *Dkc1* hipomórficos (Dkc1^m), em jejum de pelo menos 12 horas.

O estudo publicado com esse modelo (RUGGERO et al., 2003) mostra um encurtamento telomérico nos animais Dkc1^m. No entanto, não observamos diferença entre o comprimento telomérico do grupo controle (Wt) e Dkc1 hipomórfico (figura 13).

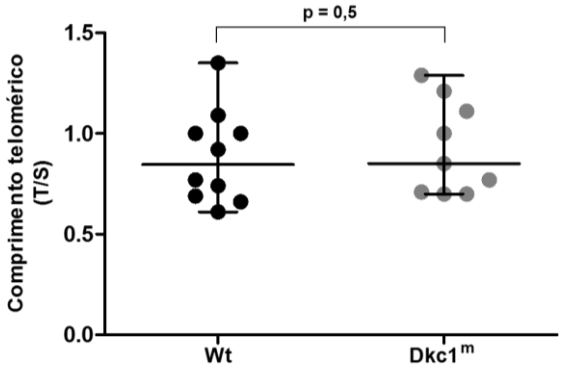


Figura 13 – Comprimento telomérico de camundongos
Comprimento telomérico (T/S) de sangue periférico de camundongos wild type (n=10) e Dkc1^m (n=9) por qPCR.

4.2 Os fibroblastos dos pacientes possuem mais DNA e massa mitocondrial, consomem mais oxigênio e produzem mais ERO mitocondrial

Ao contrário dos camundongos, as células de indivíduos e pacientes não são modelos isogênicos e o tamanho amostral (n=3) dificulta observarmos diferenças em parâmetros tão variáveis como os que compõem o metabolismo mitocondrial. Por isso, utilizamos diferentes metodologias para ratificar os fenótipos observados. Os fibroblastos dos pacientes possuem, em média, mais que o dobro do número de cópias de mtDNA em relação às células dos controles, como mostra a figura 14.

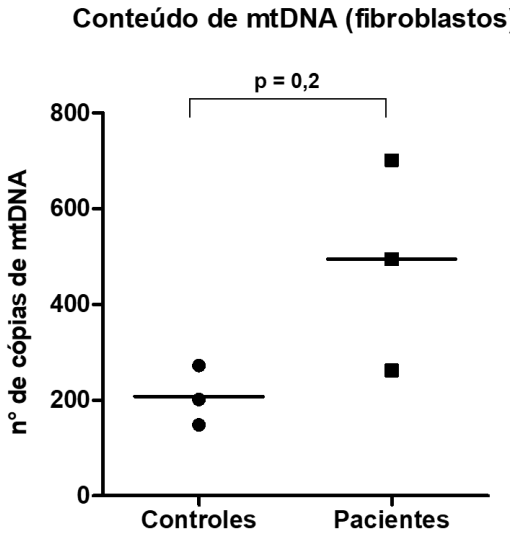


Figura 14 – Cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) em fibroblastos humanos
Número de cópias de mtDNA em fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=3) e pacientes com telomeropatias (n=3). O *MTCYTB* foi usando como gene mitocondrial e o *PK1* como gene nuclear.

Apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa (p=0,2), a mesma proporção foi observada ao quantificarmos a massa mitocondrial. As células dos pacientes apresentam, em média, duas vezes mais massa mitocondrial que os fibroblastos dos controles com telômeros normais (figura 15).

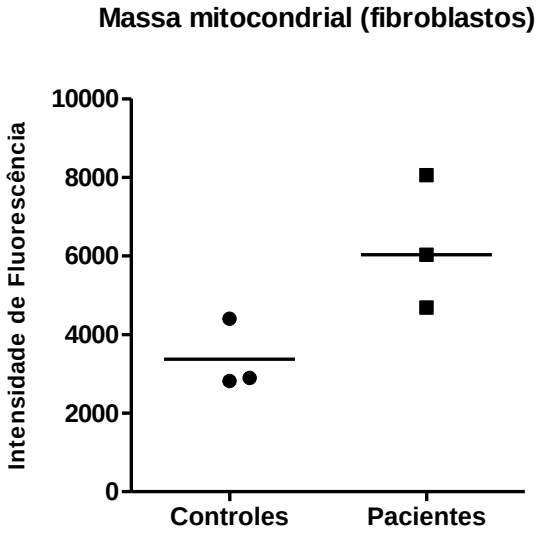


Figura 15 – Massa mitocondrial de fibroblastos humanos
Quantificação da massa mitocondrial de fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=3) e de pacientes com telomeropatias (n=3) marcados com *MitoTracker Deep Red.* (A) A intensidade de fluorescência média captada pelo citômetro de fluxo é diretamente proporcional à massa mitocondrial. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra.

No ensaio de respirometria, observamos que os fibroblastos com telômeros curtos consomem mais oxigênio que as células dos controles (figura 16), corroborando o fato de possuírem mais massa mitocondrial. Em todos os estágios da respiração (basal, *leak* e *ETS*) as células dos pacientes apresentaram, em média, uma taxa de consumo de O_2 quase duas vezes superior aos controles.

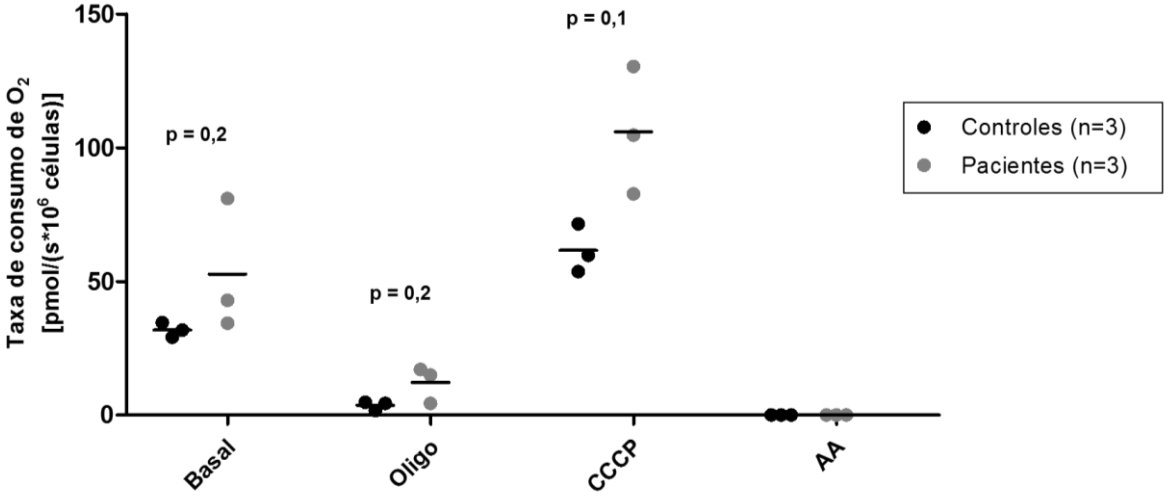


Figura 16 – Respirometria com fibroblastos humanos
Ensaio de respirometria de alta resolução com fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=3) e de pacientes com telomeropatias (n=3). Cada ponto no gráfico indica uma média da taxa de respiração das células de um indivíduo no momento em que foram adicionados oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial) e antimicina A (inibidor do complexo III).

Seguindo o padrão dos resultados anteriores, a produção de superóxido (precursor das EROs mitocôndrias) dobra nas células dos pacientes comparado aos controles, como mostra a figura 17.

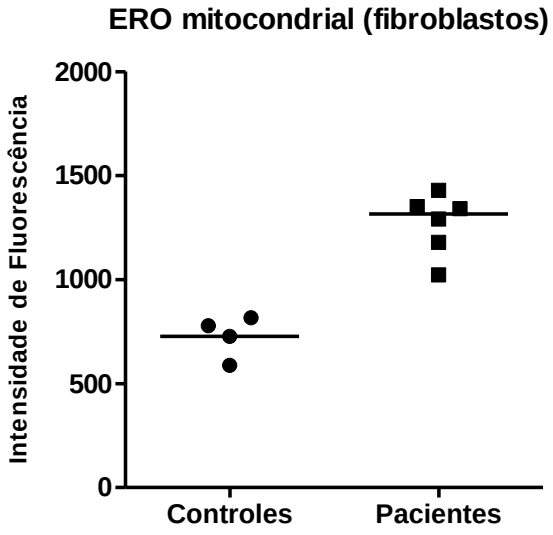


Figura 17 – Espécie reativa de oxigênio (ERO) de fibroblastos humanos
Quantificação de ERO mitocondrial (superóxido) em fibroblastos de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com telomeropatias (n=6) marcados com *MitoSOX.* A intensidade de fluorescência média captada pelo citômetro de fluxo é diretamente proporcional à quantidade da ERO mitocondrial. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra.

Além disso, realizamos ensaios de respirometria em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) derivadas de fibroblastos de um paciente (Pac1) e um indivíduos saudável (Ctrl1) para observarmos se o perfil de respiração mitocondrial se mantinha após a reprogramação (figura 18). No estágio ETS (CCCP), as iPSCs do paciente recapitularam o perfil observado nos fibroblastos que as originaram.

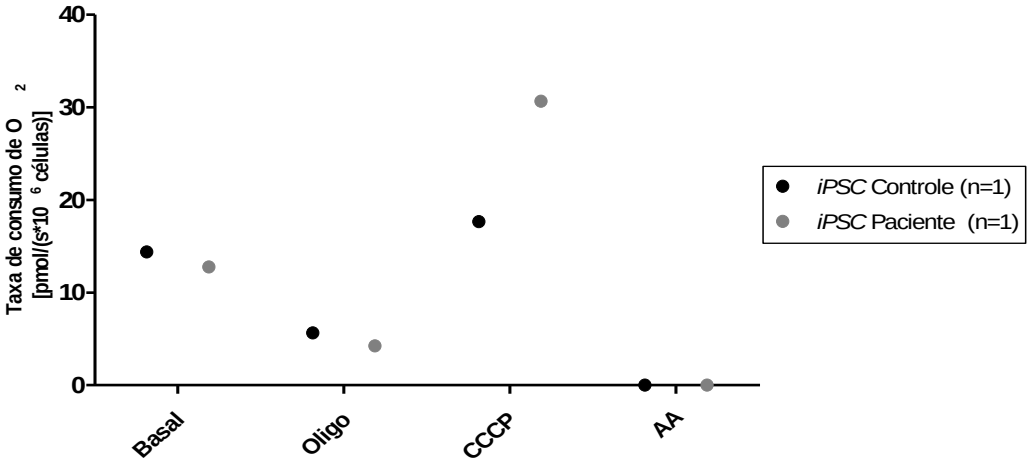


Figura 18 – Respirometria com células-tronco pluripotentes induzidas humanas
Ensaio de respirometria de alta resolução com células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) derivadas de fibroblastos de um indivíduo saudável e um paciente com

telomeropatias. Cada ponto no gráfico indica a média da taxa de respiração das células no momento em que foram adicionados oligomicina (inibidor da ATP sintase), CCCP (desacoplador mitocondrial) e antimicina A (inibidor do complexo III).

4.3 Os leucócitos do sangue periférico dos pacientes com telomeropatias também possuem maior número de cópias de DNA mitocondrial

A diferença no número de cópias de mtDNA observada nos ensaios com fibroblastos foi corroborada ao quantificamos o mtDNA nos leucócitos totais de sangue periférico (figura 19). As células dos pacientes, de fato, possuem maior número de cópia de DNA mitocondrial (p=0,01) quando comparados aos controles.

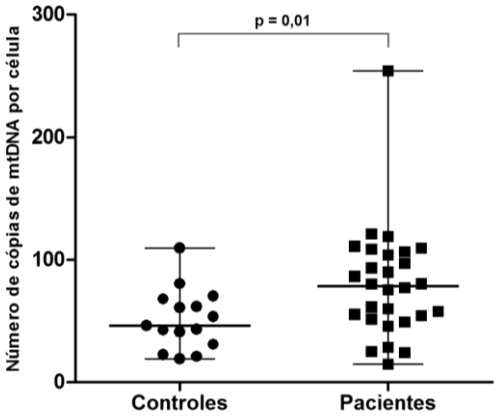


Figura 19 – Cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) de sangue periférico
Número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=15) e pacientes com telomeropatias (n=28). O *MTCYTB* foi usando como gene mitocondrial e o *PK1* como gene nuclear.

Além disso, observamos a perda da correlação entre comprimento telomérico e número de DNA mitocondrial nos pacientes com mutação no gene *TINF2* (figura 20).

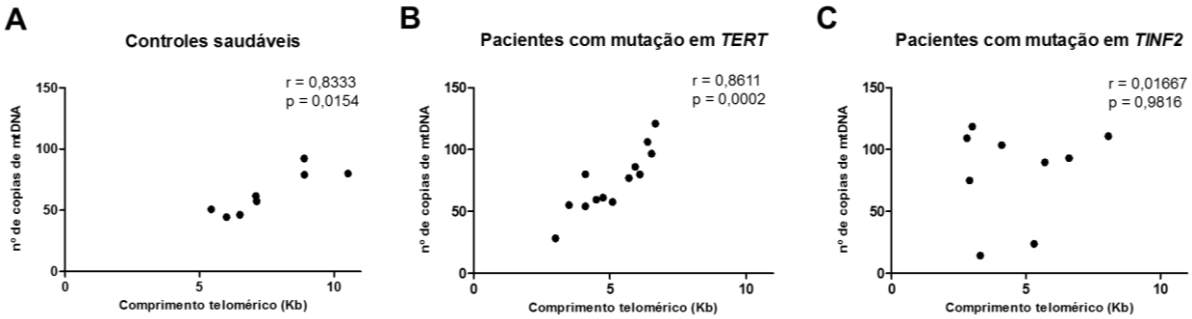


Figura 20 – Número de cópias de DNA mitocondrial e comprimento telomérico
Correlação de Spearman entre o número de cópias de DNA mitocondrial e comprimento telomérico de (A) indivíduos saudáveis (n=8), (B) pacientes com mutação em *TERT* (n=13) e (C) em *TINF2* (n=9).

4.4 Genes ligados a biogênese mitocondrial, estresse oxidativo, translocases e transportadores mitocondriais estão diferencialmente expressos nos pacientes

Avaliamos a expressão de 84 genes associados a biogênese e metabolismo mitocondrial em fibroblastos de pacientes (n=3) e indivíduos saudáveis (n=3). No mapa de calor abaixo (figura 21), observa-se um agrupamento por similaridade entre pacientes e controles quanto ao perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos.

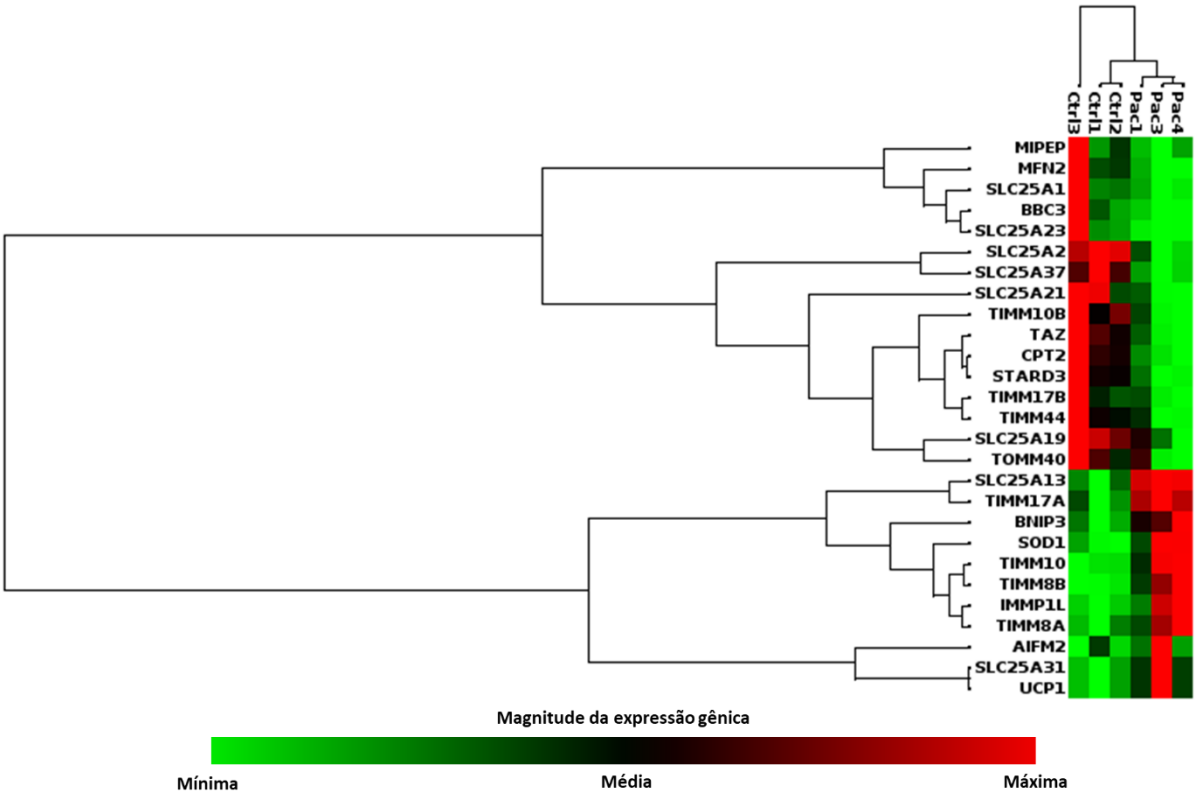


Figura 21 – Mapa de calor (*heatmap*) dos genes diferencialmente expressos
O *heatmap* mostra 26 genes diferencialmente expressos em pacientes e indivíduos saudáveis, relacionados à biogênese e função mitocondrial. Cada linha representa um gene e cada coluna uma amostra de RNA de fibroblastos. A intensidade do verde é proporcional ao nível de inibição da expressão do RNA e a intensidade do vermelho representa o quão mais expresso o gene está em relação aos genes de constitutivos (B2M e RPLP0). Mapa de calor completo no apêndice C.

Os genes que codificam a translocase da membrana mitocondrial externa, TOMM40, e as translocases da membrana mitocondrial interna, TIMM 10B, 17B e 44 apresentaram-se reprimido, enquanto os genes das TIMM 17A, 8A, 8B e 10 estavam induzidos nas células dos pacientes.

Alguns genes que codificam proteínas da família de transportadores mitocondriais SLC25 apresentaram-se diferencialmente expressos nos pacientes. Os genes *SLC25A* 13 e 31 estavam mais expressos, enquanto que SLC25A 1, 2, 19, 21, 23 e 37 estavam reprimidos nos fibroblastos dos pacientes. O gene *UCP1* que codifica a proteína desacopladora 1, que também faz parte da família SLC25 estava mais expresso nos pacientes.

Em dois dos três pacientes (Pac3 e Pac4), o gene da proteína de fissão da membrana interna mitocondrial (FIS1) estava inibido, e o gene da proteína fusão (OPA1), mais expresso (apêndice C). O mesmo foi observado com *TP53* que estava inibido nesses dois pacientes. Outros genes ligados a estresse oxidativo (*SOD1*), proteínas de transportes (STARD3 e CPT2), sinalizadores (BNIP3, BBC3 e AIP), peptidases (IMMP1L e MIPEP) também apresentaram-se diferencialmente expressos nas células dos pacientes.

4.5 Pacientes com telômeros curtos apresentam mais variantes somáticas

Os elevados níveis de ERO nas células dos pacientes com telômeros curtos nos fez questionar sobre possíveis danos oxidativos ao material genético. Para evidenciarmos se os pacientes com anemia aplástica (AA) e telômeros curtos apresentavam mais variantes somáticas que os pacientes com telômeros normais, decidimos reanalisar dados de NGS e comparar esses dois grupos. O gráfico abaixo mostra a porcentagem de indivíduos com AA que apresentam variantes somáticas, agrupados por comprimento telomérico normal e curto (figura 22). No total, foram identificadas variantes somáticas em 87,9% (29/33) dos pacientes com telômeros curtos, contra 51,3% (20/39) dos pacientes com telômeros normais. Observa-se que há diferença entre os dois grupos em qualquer faixa etária.

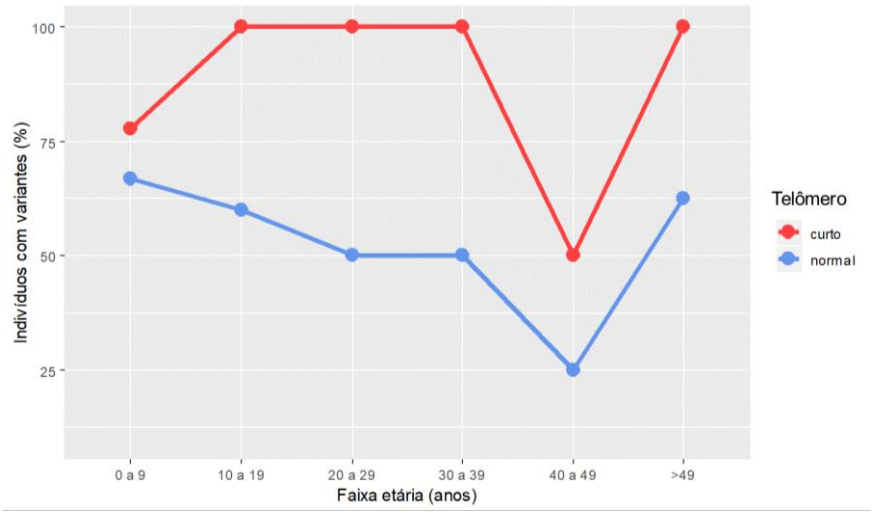


Figura 22 – Porcentagem de pacientes com variantes somáticas
Porcentagem de pacientes com telômeros curtos (<10º percentil) e normais que possuem variantes somáticas em diferentes faixas etárias. Os 72 indivíduos analisados apresentam anemia aplástica adquirida ou congênita (disceratose congênita).

Em relação ao número de variantes somáticas por pacientes, a diferença é mais evidente quando observamos a base do *violin plot* (figura 23). No grupo de indivíduos com telômeros curtos, apenas 12,1% (4/33) não apresentaram variantes somáticas em comparação a 48,7% (19/39) no grupo com telômeros normais. Em 57,6% (19/33) dos indivíduos com telômeros curtos e em 33,3% (13/39) pacientes com telômeros normais, foi observada uma única variante somática. Duas ou mais variantes foram observadas em 30,3% (10/33) dos pacientes com telômeros curtos e 17,9% (7/39) pacientes com telômeros normais.

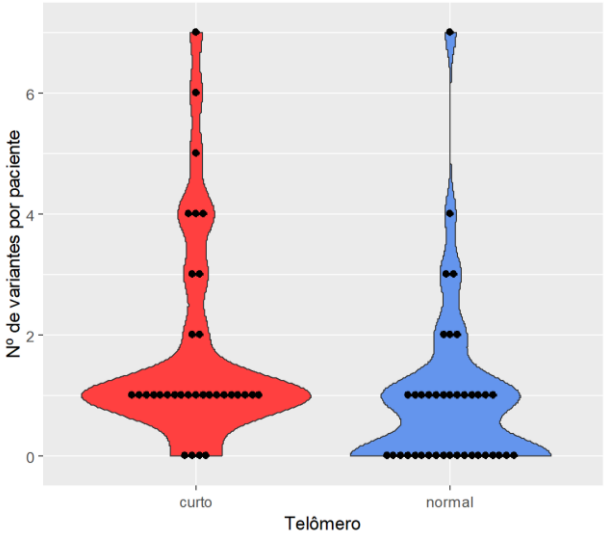


Figura 23 – *Violin plot* do número de variantes somáticas
Número de variantes somáticas por paciente com anemia aplástica (n=72) adquirida ou congênita (disceratose congênita). Telômeros curtos (<10º percentil).

No que se refere à frequência alélica dessas variantes observa-se que a maior parte das variantes de pacientes com telômeros normais têm frequências abaixo de 10% (figura 24). A frequência das variantes dos indivíduos com telômeros curtos apresenta uma distribuição mais simétrica em comparação ao outro grupo. Ao observarmos as variantes acima de 30%, notamos que o grupo de telômeros curtos tem mais que o dobro de variantes com alta frequência.

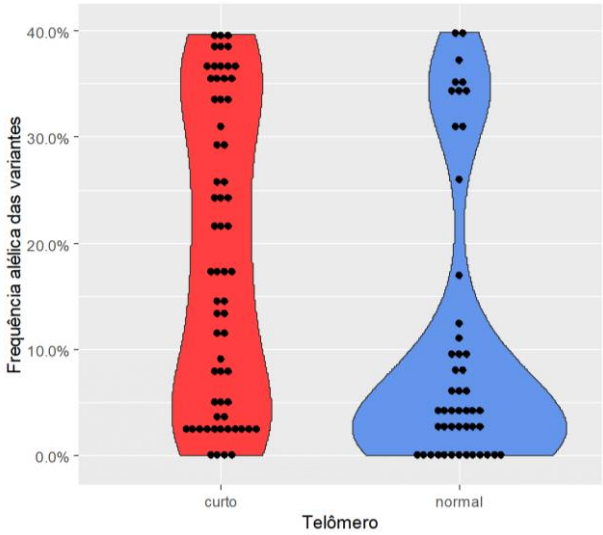


Figura 24 – *Violin plot* de frequência alélica das variantes somáticas
Frequência alélica de cada variante somática encontrada em amostra de pacientes com anemia aplástica (n=72) adquirida ou congênita (disceratose congênita). Telômero curto (<10º percentil).

DISCUSSÃO

5 Discussão

O modelo murino, comumente utilizado no estudo das telomeropatias, vem sendo questionado por pesquisadores da área, pois o *M. musculus* possui telômeros de tamanho 5 a 10 vezes superior ao humano e vive apenas 3 anos (CALADO; DUMITRIU, 2013). Usando como exemplo os camundongos nocautes para os genes *Tert* e *Terc*, são necessárias 3 ou 4 gerações de cruzamento entre animais homozigotos para observarmos o encurtamento telomérico e os fenótipos de telomeropatias (LIU et al., 2000). Os animais utilizados nesse estudo foram doados ao nosso laboratório pelo pesquisador Dr Davide Ruggero, que desenvolveu camundongos hipormórficos para o gene *Dkc1*. No estudo do Ruggero, esses animais apresentaram baixa expressão da proteína Dkc1, levando ao encurtamento telomérico (RUGGERO et al., 2003). No entanto, suspeitamos que, ao longo das gerações na nossa colônia, esses animais desenvolveram mecanismos para recuperarem a erosão telomérica, pois não observamos encurtamento telomérico nos camundongos hipomórficos. Acreditamos que esse tenha sido o motivo de não observarmos diferenças metabólicas entre o grupo controle e $Dkc1^{m}$.

Telômero e mitocôndria dividem o protagonismo no processo de senescência celular. Os mecanismos de senescência normalmente impulsionam o envelhecimento, mas também podem atuar como supressores tumorais. Ambas as funções dependem do estabelecimento do chamado fenótipo senescente. O grupo do Dr João Passos, da *Newcastle University* (Inglaterra), elucidou um dos papeis da mitocôndria no desenvolvimento desse fenótipo senescente (CORREIA-MELO et al., 2016). Os autores estabeleceram uma nova via de sinalização de senescência que ativa a biogênese mitocondrial por meio de ATM, Akt, mTOR e PGC-1β. Segundo Correia-Melo et al (2016), o incremento da biogênese mitocondrial aumenta a produção de EROs, ativando mecanismos de resposta a dano no DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*), que leva a parada do ciclo celular, com o objetivo de estabilizar da senescência (CORREIA-MELO et al., 2016).

O pesquisador Dr. Luis Batista, da *Washington University* (EUA), apresentou os resultados preliminares de sua linha de pesquisa que envolve encurtamento telomérico e disfunção mitocondrial no workshop "*Telomeres in health, aging, and disease*" na UNESP de Botucatu-SP (dezembro de 2017). O grupo do Dr Batista inseriu a mutação p.A353V no gene *DKC1* em células-tronco embrionárias (CTEs)

humanas. Essa mutação é conhecida por causar encurtamento telomérico acentuado em paciente com DC (KNIGHT et al., 1999). Nas CTEs com a mutação, observou-se maior expressão de PGC1-α, aumento no tamanho das mitocôndrias e elevado consumo de oxigênio, em comparação ao seu controle isogênico (anais do evento - dados não publicados). Essas características são comparáveis ao fenótipo senescente proposto por Correia-Melo e colaboradores (2016).

Desse modo, os achados dos grupos de Passos e Batista corroboram com o que observamos em nosso trabalho. Os fibroblastos dos pacientes com telomeropatias têm, em média, duas vezes mais massa mitocondrial que as células dos controles. É provável que a biogênese mitocondrial aumentada, nas células com telômeros reduzidos, seja consequência de um fenótipo senescente. Além disso, nos fibroblastos de dois pacientes do presente estudo, *FIS1* estava inibida e *OPA1*, mais expressa, o que indica um estado de fusão mitocondrial (WESTERMANN, 2010). Mitocôndrias maiores ou mais fusionadas sugerem estresse e/ou senescência celular (LEE et al., 2007; ZIEGLER; WILEY; VELARDE, 2015). Os nossos resultados e os do grupo do Dr. Batista, mostrando aumento da biogênese mitocondrial, vão de encontro ao que foi proposto pelo grupo do Dr. DePinho. Sahin e DePinho (2012) associam o encurtamento telomérico à inibição do PGC1 α e β via p53, reduzindo a biogênese e função mitocondrial. No entanto, esses dados vêm sendo questionados por pesquisados da área pela baixa reprodutibilidade.

O incremento da massa mitocondrial, aumentando a taxa de respiração, tem como consequência a maior produção da ERO mitocondrial, como observados nos fibroblastos dos nossos pacientes. Para conter o aumento do superóxido, essas células superexpressam a superóxido dismutase 1 (SOD1). No entanto, a alta expressão de SOD1 não é suficiente para reduzir a concentração das EROs mitocondriais, levando a célula a expressar UCP1 (termogenina), proteína que pode desempenhar uma função anti-oxidante, permitindo o vazamento de prótons H^+ do meio intermembranar para a matriz mitocondrial (OELKRUG et al., 2014).

O incremento na biogênese mitocondrial pode explicar o maior número de cópias de mtDNA observado nas células dos pacientes com telomeropatias. Além disso, as EROs podem causar mutações no material genético mitocondrial desregulando o controle da sua replicação (MALIK; CZAJKA, 2013). Alguns estudos mostram que há correlação entre o número de cópias de mtDNA e comprimento telomérico (KIM et al., 2013; TYRKA et al., 2015). Nós observamos correlação nos

grupos controle e de pacientes com mutação em *TERT*. No entanto, essa correlação deixa de existir nos pacientes com mutação em *TINF2*. O gene *TINF2* codifica TIN2, uma das proteínas do telossomo. No caso dos pacientes com mutação em *TINF2*, ocorre o encurtamento telomérico pelo fato da proteína TIN2 deficiente não recrutar a telomerase para alongar os telômeros (FRANK et al., 2015). Com isso, sugerimos que a correlação entre telômero e mtDNA existe apenas quando o comprimento telomérico é mantido pela telomerase. Além disso, Chen e colaboradores descreveram uma nova função para a proteína TIN2 (CHEN et al., 2012). Segundo eles, TIN2 também se localizar na membrana interna da mitocôndria, regulando a sua forma e função. Concluíram que a presença da TIN2 na mitocôndria aumenta a produção de ATP e sua ausência diminui a geração de EROs (CHEN et al., 2012). A falta de correlação entre o número de cópias de mtDNA e comprimento telomérico dos pacientes com mutação em *TINF2* também pode ser consequência dessa função extra-telomérica da proteína TIN2.

A nível tecidual, o aumento na geração de EROs mitocondrial induz processos inflamatórios que podem explicar o acometimento de órgãos com baixa taxa replicativa, como fígado e pulmão, nos pacientes com telomeropatias. Diversas evidências apontam que o estresse oxidativo e a inflamação são os eventos patogênicos mais importantes nas doenças hepáticas independentemente da etiologia (revisado em REYES-GORDILLO; SHAH; MURIEL, 2017). De maneira semelhante, alguns estudos demostraram a importância das EROs na fisiopatologia da fibrose pulmonar idiopática (CHERESH et al., 2013), propondo que a mitocôndria desempenha um papel central na patogênese da doença (revisado por MORA; BUENO; ROJAS, 2017).

O estresse oxidativo também pode contribuir para a disfunção das CTHs. Se as células da medula óssea dos pacientes com telomeropatias apresentarem níveis elevados na produção de ERO, como observado nos fibroblastos, o estresse oxidativo pode estar potencializando a insuficiência medular desses indivíduos. Porto e colaboradores (2015) evidenciaram, em camundongos idosos, que o incremento na produção de EROs aumenta apoptose e senescência das CTHs e diminui a sua capacidade de diferenciação. Chatterjee e Law (2018) constataram que a geração de EROs desempenha um papel central na aplasia de medula óssea, por meio de modificações epigenéticas, desencadeando apoptose e consequente redução

quantitativa de componentes do nicho hematopoético. Esses estudos também apontam para um aumento nos níveis de danos no DNA.

Danos no material genético, gerando mutações somáticas, podem ajudar a explicar a maior incidência de neoplasias nos pacientes com telomeropatias. Observamos, no nosso estudo, que pacientes com aplasia de medula e telômeros curtos apresentam maior número de variantes somáticas, com frequências alélicas mais altas e, portanto, mais hematopoese clonal. As variantes encontradas nesses pacientes têm sido associadas à maior propensão a evolução para neoplasias hematológicas (ABELSON et al., 2018). Já é descrito que indivíduos com DC e AA apresentam alta frequência de hematopoese clonal, com mutações em genes associados à SMD e LMA (PERDIGONES et al., 2016). Sugerimos que o estresse oxidativo nas CTHs dos pacientes com telômeros curtos é o agente causador dessas variantes somáticas, que além de aumentar os riscos a neoplasias, pode afetar a autorrenovação da CTHs. Yahata e coautores (2011) afirmam que o acúmulo de danos oxidativos no DNA das CTHs ativa a expressão de inibidores do ciclo celular, levando à senescência prematura e, consequentemente, à perda da função dessas células-tronco.

Nos nossos experimentos, utilizamos células de pacientes com mutações germinativas que causam encurtamento telomérico. Por isso, entendemos que, no nosso contexto, a erosão dos telômeros seja a causa inicial que provoca o aumento na produção de ERO mitocondrial. No entanto, isso não impede que o estresse oxidativo, fruto do metabolismo mitocondrial, também interfira no encurtamento dos telômeros (VON ZGLINICKI, 2002). Desse modo, acreditamos numa relação bidirecional entre a biologia dos telômeros e o funcionamento mitocondrial. Nas condições patológicas dos nossos pacientes, sugerimos que há uma retroalimentação na qual o telômero curto aumenta a produção de EROs, que gera um estresse oxidativo, acelerando ainda mais o encurtamento telomérico.

O transplante do órgão ou tecido afetado é a principal alternativa terapêutica oferecida a pacientes acometidos com alguma telomeropatia (CALADO; YOUNG, 2009). Recentemente, ensaios clínicos com uso de esteroides sintéticos (danazol ou nandrolona) demonstram melhoras nas contagens hematológicas e na função pulmonar desses pacientes (TOWNSLEY et al., 2016; CALADO, fase final do ensaio clínico nº NCT02055456). Apesar de promissores, esses tratamentos ainda trazem muitos efeitos colaterais, podendo causar outras enfermidades ou até levar o paciente

a óbito. Com a melhor compreensão da relação entre telômero e metabolismo mitocondrial podem surgir novas estratégias terapêuticas baseando-se, por exemplo, no uso de antioxidantes para reestabelecer a homeostase redox nos tecidos afetados e reduzir efeitos adversos dos tratamentos convencionais. Alguns pesquisadores já mostraram os possíveis efeitos do uso de terapias antioxidantes em DC e FP (PEREBOEVA et al., 2014).

O presente trabalho, mostrou pela primeira vez, em células primárias de pacientes com telomeropatias, os efeitos do encurtamento telomérico sobre o funcionamento mitocondrial, anteriormente elucidados em linhagens celulares e animais nocautes. Para darmos mais robustez a esses achados, será necessário confirma-los em um número maior de pacientes, com diferentes mutações e fenótipos clínicos, afim de compreender se a disfunção mitocondrial é comum a todos os indivíduos com telômeros curtos. A figura 25 resume os principais resultados do nosso estudo, apontando as possíveis consequências clínicas.

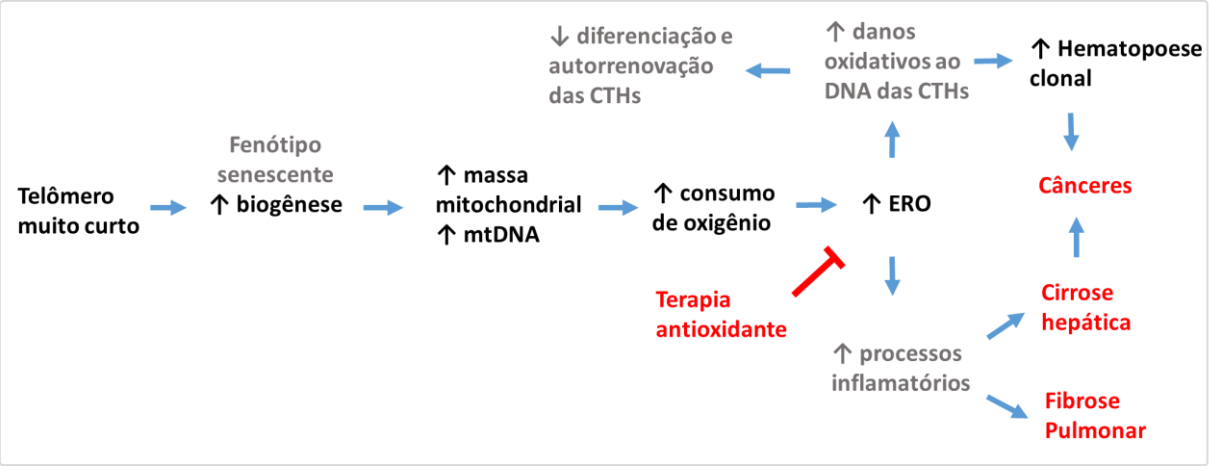


Figura 25 – Figura resumo
O fluxograma resume os achados experimentais (em preto), inferências a partir de dados publicados (em cinza) e as possíveis implicações clínicas e terapêuticas (em vermelho). Em resumo, observamos que o encurtamento telomérico gera um fenótipo senescente que aumenta a biogênese mitocondrial. Como consequência, a massa mitocondrial, o conteúdo de mtDNA, o consumo de oxigênio e a geração de espécie reativa de oxigênio (ERO) também aumentam nas células dos pacientes. As EROs desempenham um papel fundamental na patogênese da fibrose pulmonar e cirrose hepática. Além disso, supomos que o desequilíbrio redox cause danos oxidativos nas células-tronco hematopoéticas (CTHs) que pode afetar a sua função e/ou aumentar a incidência de hematopoese clonal, elucidando a alta prevalência de neoplasias hematológicas nesses pacientes. Terapias antioxidantes poderiam reduzir os efeitos das EROs na fisiopatologia das telomeropatias.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

- Fibroblastos de pacientes com telômeros curtos têm mais massa mitocondrial como consequência de um fenótipo senescente;
- O incremento na biogênese mitocondrial aumenta o conteúdo de mtDNA, o consumo de oxigênio e a produção de ERO nas células de pacientes com telomeropatias;
- O desbalanço oxidativo nas células dos pacientes pode gerar processos inflamatórios em órgão como fígado e pulmão, e afetar a diferenciação e autorrenovação das CTHs;
- Os pacientes com falência medular e telômeros curtos têm mais variantes somáticas no sangue periférico;
- As variantes somáticas encontradas nos pacientes com telômeros curtos pode ser consequência de danos oxidativos no DNA das CTHs e a causa de neoplasias hematológicas.

REFERÊNCIAS

7 Referências

ABELSON, S.; COLLORD, G.; NG, S. W. K.; WEISSBROD, O.; MENDELSON COHEN, N.; NIEMEYER, E.; BARDA, N.; ZUZARTE, P. C.; HEISLER, L.; SUNDARAVADANAM, Y.; LUBEN, R.; HAYAT, S.; WANG, T. T.; ZHAO, Z.; CIRLAN, I.; PUGH, T. J.; SOAVE, D.; NG, K.; LATIMER, C.; HARDY, C.; RAINE, K.; JONES, D.; HOULT, D.; BRITTEN, A.; MCPHERSON, J. D.; JOHANSSON, M.; MBABAALI, F.; EAGLES, J.; MILLER, J. K.; PASTERNACK, D.; TIMMS, L.; KRZYZANOWSKI, P.; AWADALLA, P.; COSTA, R.; SEGAL, E.; BRATMAN, S. V.; BEER, P.; BEHJATI, S.; MARTINCORENA, I.; WANG, J. C. Y.; BOWLES, K. M.; QUIRÓS, J. R.; KARAKATSANI, A.; LA VECCHIA, C.; TRICHOPOULOU, A.; SALAMANCA-FERNÁNDEZ, E.; HUERTA, J. M.; BARRICARTE, A.; TRAVIS, R. C.; TUMINO, R.; MASALA, G.; BOEING, H.; PANICO, S.; KAAKS, R.; KRÄMER, A.; SIERI, S.; RIBOLI, E.; VINEIS, P.; FOLL, M.; MCKAY, J.; POLIDORO, S.; SALA, N.; KHAW, K.-T.; VERMEULEN, R.; CAMPBELL, P. J.; PAPAEMMANUIL, E.; MINDEN, M. D.; TANAY, A.; BALICER, R. D.; WAREHAM, N. J.; GERSTUNG, M.; DICK, J. E.; BRENNAN, P.; VASSILIOU, G. S.; SHLUSH, L. I. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. **Nature**, v. 559, n. 7714, p. 400–404, 9 jul. 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-018-0317-6>. Acesso em: 6 ago. 2018.

AHMED, S.; PASSOS, J. F.; BIRKET, M. J.; BECKMANN, T.; BRINGS, S.; PETERS, H.; BIRCH-MACHIN, M. a; VON ZGLINICKI, T.; SARETZKI, G. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. **Journal of cell science**, v. 121, p. 1046–1053, 2008.

ALVES-PAIVA, R. M.; KAJIGAYA, S.; FENG, X.; CHEN, J.; DESIERTO, M.; WONG, S.; TOWNSLEY, D. M.; DONAIRES, F. S.; BERTOLA, A.; GAO, B.; YOUNG, N. S.; CALADO, R. T. Telomerase enzyme deficiency promotes metabolic dysfunction in murine hepatocytes upon dietary stress. **Liver International**, 25 jul. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13529>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BAI, R.-K.; WONG, L.-J. C. Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 7, n. 5, p. 613–22, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157810605958>.

BERTUCH, A. A. The Molecular Genetics of the Telomere Biology Disorders. **RNA Biology**, v. 6286, n. September, p. 00–00, 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2015.1094596>.

BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v. 350, p. 569–573, 1991.

BUSQUE, L.; PATEL, J. P.; FIGUEROA, M. E.; VASANTHAKUMAR, A.; PROVOST, S.; HAMILOU, Z.; MOLLICA, L.; LI, J.; VIALE, A.; HEGUY, A.; HASSIMI, M.; SOCCI, N.; BHATT, P. K.; GONEN, M.; MASON, C. E.; MELNICK, A.; GODLEY, L. A.; BRENNAN, C. W.; ABDEL-WAHAB, O.; LEVINE, R. L. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 11, p. 1179–1181, 23 nov. 2012. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ng.2413>. Acesso em: 17 out. 2018.

CALADO, R. T.; DUMITRIU, B. Telomere dynamics in mice and humans. **Seminars in hematology**, v. 50, n. 2, p. 165–74, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3742037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 12, p. 1150, 2009a.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–2365, 10 dez. 2009b. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0903373>. Acesso em: 7 ago. 2018.

CHATTERJEE, R.; LAW, S. Epigenetic and microenvironmental alterations in bone marrow associated with ROS in experimental aplastic anemia. **European Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 1, p. 32–43, 1 jan. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933517302121?via%3Dihub>. Acesso em: 19 out. 2018.

CHEN, X. J.; BUTOW, R. a. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 11, p. 815–825, 2005.

CHERESH, P.; KIM, S.-J.; TULASIRAM, S.; KAMP, D. W. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 7, p. 1028–1040, 1 jul. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912002827?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2018.

CHOI, Y. S.; KIM, S.; PAK, Y. K. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 54, n. Supplement 2, p. S3–S9, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T5Y-44HXS95-3/2/283885523991bb407b66613e3ac7bf8e>.

CORREIA-MELO, C.; MARQUES, F. D. M.; ANDERSON, R.; HEWITT, G.; HEWITT, R.; COLE, J.; CARROLL, B. M.; MIWA, S.; BIRCH, J.; MERZ, A.; RUSHTON, M. D.; CHARLES, M.; JURK, D.; TAIT, S. W. G.; CZAPIEWSKI, R.; GREAVES, L.; NELSON, G.; BOHLOOLY-Y, M.; RODRIGUEZ-CUENCA, S.; VIDAL-PUIG, A.; MANN, D.; SARETZKI, G.; QUARATO, G.; GREEN, D. R.; ADAMS, P. D.; VON ZGLINICKI, T.; KOROLCHUK, V. I.; PASSOS, J. F. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. **The EMBO journal**, v. 35, n. 7, p. 724–42, 1 abr. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848154>. Acesso em: 20 out. 2018.

DE LANGE, T. T-loops and the origin of telomeres. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 4, p. 323–329, 2004.

DE LANGE, T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes and Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 2005.

DOKAL, I. Dyskeratosis congenita in all its forms. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 4, p. 768–779, 2000.

FOUQUEREL, E.; LORMAND, J.; BOSE, A.; LEE, H.-T.; KIM, G. S.; LI, J.; SOBOL, R. W.; FREUDENTHAL, B. D.; MYONG, S.; OPRESKO, P. L. Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 12, p. 1092–1100, 7 dez. 2016. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/nsmb.3319>. Acesso em: 21 out. 2018.

GORDON, D. M.; SANTOS, J. H. The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, p. 1–7, 2010.

GRAMATGES, M. M.; BERTUCH, A. A. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 162, n. 6, p. 353–63, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3834083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. **Cell**, v. 43, n. 2 Pt 1, p. 405–413, 1985.

GRIFFITH, J. D.; COMEAU, L.; ROSENFIELD, S.; STANSEL, R. M.; BIANCHI, A.; MOSS, H.; DE LANGE, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 503–514, 1999.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F.; SANTANA-LEMOS, B. a.; SCHEUCHER, P. S.; ALVES-PAIVA, R. M.; CALADO, R. T. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113747, 2014. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0113747>.

HAENDELER, J.; DRÖSE, S.; BÜCHNER, N.; JAKOB, S.; ALTSCHMIED, J.; GOY, C.; SPYRIDOPOULOS, I.; ZEIHER, A. M.; BRANDT, U.; DIMMELER, S. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 6, p. 929–935, 2009.

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

HEISS, N. S.; KNIGHT, S. W.; VULLIAMY, T. J.; KLAUCK, S. M.; WIEMANN, S.; MASON, P. J.; POUSTKA, a; DOKAL, I. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. **Nature genetics**, v. 19, n. 1, p. 32–38, 1998.

KIPLING, D.; COOKE, H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. **Letters To Nature**, v. 347, p. 400–402, 1990.

KNIGHT, S.; VULLIAMY, T.; COPPLESTONE, A.; GLUCKMAN, E.; MASON, P.; DOKAL, I. Dyskeratosis Congenita (DC) Registry: identification of new features of DC. **British journal of haematology**, v. 103, n. 4, p. 990–6, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886310>.

KNIGHT, S. W.; HEISS, N. S.; VULLIAMY, T. J.; GRESCHNER, S.; STAVRIDES, G.; PAI, G. S.; LESTRINGANT, G.; VARMA, N.; MASON, P. J.; DOKAL, I.; POUSTKA, A. X-Linked Dyskeratosis Congenita Is Predominantly Caused by Missense Mutations in the DKC1 Gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 1, p. 50–58, 1 jul. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707637276?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2018.

KOVALENKO, O. a.; CARON, M. J.; ULEMA, P.; MEDRANO, C.; THOMAS, A. P.; KIMURA, M.; BONINI, M. G.; HERBIG, U.; SANTOS, J. H. A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. **Aging Cell**, v. 9, n. 2, p. 203–219, 2010.

LEE, S.; JEONG, S.-Y.; LIM, W.-C.; KIM, S.; PARK, Y.-Y.; SUN, X.; YOULE, R. J.; CHO, H. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 31, p. 22977–83, 3 ago. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545159>. Acesso em: 20 out. 2018.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451168>. Acesso em: 21 out. 2018.

LINGNER, J.; HUGHES, T. R.; SHEVCHENKO, a; MANN, M.; LUNDBLAD, V.; CECH, T. R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5312, p. 561–567, 1997.

LIU, D.; O'CONNOR, M. S.; QIN, J.; SONGYANG, Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51338–51342, 2004.

LIU, Y.; SNOW, B. .; HANDE, M. .; YEUNG, D.; ERDMANN, N. .; WAKEHAM, A.; ITIE, A.; SIDEROVSKI, D. .; LANSDORP, P. .; ROBINSON, M. .; HARRINGTON, L. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. **Current Biology**, v. 10, n. 22, p. 1459–1462, 14 nov. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982200008058?via%3Dihub#FIG2>. Acesso em: 20 out. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629?via%3Dihub>. Acesso em: 18 out. 2018.

MAIDA, Y.; YASUKAWA, M.; FURUUCHI, M.; LASSMANN, T.; POSSEMATO, R.; OKAMOTO, N.; KASIM, V.; HAYASHIZAKI, Y.; HAHN, W. C.; MASUTOMI, K. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 230–235, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08283>.

MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; MOYZIS, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)n among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 18, p. 7049–7053, 1989.

MONACA, E. La; FODALE, V. Effects of anesthetics on mitochondrial signaling and function. **Current Drug Safety**, v. 7, n. 2, p. 126–139, 2012.

MORA, A. L.; BUENO, M.; ROJAS, M. Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 2, p. 405–414, 1 fev. 2017. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/87440>. Acesso em: 10 jul. 2018.

MORTEN, K. J.; ASHLEY, N.; WIJBURG, F.; HADZIC, N.; PARR, J.; JAYAWANT, S.; ADAMS, S.; BINDOFF, L.; BAKKER, H. D.; MIELI-VERGANI, G.; ZEVIANI, M.; POULTON, J. Liver mtDNA content increases during development: A comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. **Mitochondrion**, v. 7, n. 6, p. 386–395, 2007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724907002401>.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5ª ed. New York: W.H.F REEMAANN DC OMPANY, 2008. v. 2

OELKRUG, R.; GOETZE, N.; MEYER, C. W.; JASTROCH, M. Antioxidant properties of UCP1 are evolutionarily conserved in mammals and buffer mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 210–216, 1 dez. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914004237?via%3Dihub#f0025>. Acesso em: 20 out. 2018.

OLOVNIKOV, a M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **Journal of theoretical biology**, v. 41, n. 1, p. 181–190, 1973.

PAIVA, R. M. A.; CALADO, R. T. Telomere Dysfunction and Hematologic Disorders. In: CALADO, R. T. (Ed.). **Progress in Molecular Biology - Telomeres in Health and Disease**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 146–170.

PERDIGONES, N.; PERIN, J. C.; SCHIANO, I.; NICHOLAS, P.; BIEGEL, J. A.; MASON, P. J.; BABUSHOK, D. V; BESSLER, M. Clonal hematopoiesis in patients with dyskeratosis congenita. **Am. J. Hematol**, v. 91, p. 1227–1233, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ajh.24552>. Acesso em: 11 jul. 2018.

PEREBOEVA, L.; WESTIN, E.; HUBBARD, M.; GOLDMAN, F. D. Consistent Upregulation of Oxidative Stress and DNA Damage Amongst Dyskeratosis Congenita Genotypes: Ameliorative Effects of Antioxidants. **Blood**, v. 124, n. 21, 2014. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/1603?sso-checked=true>. Acesso em: 21 out. 2018.

PORTO, M. L.; RODRIGUES, B. P.; MENEZES, T. N.; CESCHIM, S. L.; CASARINI, D. E.; GAVA, A. L.; PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C.; CAMPAGNARO, B. P.; MEYRELLES, S. S. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 97, 24 dez. 2015. Disponível em: <http://www.jbiomedsci.com/content/22/1/97>. Acesso em: 19 out. 2018.

REYES-GORDILLO, K.; SHAH, R.; MURIEL, P. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Current and Future Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–2, 22 jan. 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/3140673/>. Acesso em: 10 jul. 2018.

RUGGERO, D.; GRISENDI, S.; PIAZZA, F.; REGO, E.; MARI, F.; RAO, P. H.; CORDON-CARDO, C.; PANDOLFI, P. P. Dyskeratosis congenita and cancer in mice

deficient in ribosomal RNA modification. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5604, p. 259–262, 2003.

SAHIN, E.; COLLA, S.; LIESA, M.; MOSLEHI, J.; MÜLLER, F. L.; GUO, M.; COOPER, M.; KOTTON, D.; FABIAN, A. J.; WALKEY, C.; MASER, R. S.; TONON, G.; FOERSTER, F.; XIONG, R.; WANG, Y. A.; SHUKLA, S. a; JASKELIOFF, M.; MARTIN, E. S.; HEFFERNAN, T. P.; PROTOPOPOV, A.; IVANOVA, E.; MAHONEY, J. E.; KOST-ALIMOVA, M.; PERRY, S. R.; BRONSON, R.; LIAO, R.; MULLIGAN, R.; SHIRIHAI, O. S.; CHIN, L.; DEPINHO, R. a. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, p. 359–365, 2011.

SAHIN, E.; DEPINHO, R. a. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 397–404, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3352>.

SALABEI, J. K.; GIBB, A. A.; HILL, B. G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. **Nature Protocols**, v. 9, n. 2, p. 421–438, 23 fev. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nprot.2014.018>. Acesso em: 17 out. 2018.

SANTOS, J. H.; MEYER, J. N.; SKORVAGA, M.; ANNAB, L. a.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. **Aging Cell**, v. 3, n. 6, p. 399–411, 2004.

SANTOS, J. H.; MEYER, J. N.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 11, p. 1757–1768, 2006.

SAVAGE, S.; ALTER, B. Dyskeratosis Congenita. **Hematol Oncol Clin North Am.**, v. 23, n. 2, p. 215–231, 2010.

SHIMAMURA, A. Aplastic anemia and clonal evolution: germ line and somatic genetics. **Hematology**, v. 2016, n. 1, p. 74–82, 1 dez. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27913465>. Acesso em: 11 jul. 2018.

TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; LIU, D.; BIANCOTTO, A.; WEINSTEIN, B.; CHEN, C.; HARDY, N.; MIHALEK, A. D.; LINGALA, S.; KIM, Y. J.; YAO, J.; JONES, E.; GOCHUICO, B. R.; HELLER, T.; WU, C. O.; CALADO, R. T.; SCHEINBERG, P.; YOUNG, N. S. Danazol Treatment for Telomere Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1922–1931, 2016. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1515319>.

TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S.; TOOZE, J. A.; MARSH, J. C.; GORDON-SMITH, E. C. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2775–83, 30 out. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572992>. Acesso em: 7 ago. 2018.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 7, p. 339–344, 1 jul. 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000402021102?via%3Dihub>. Acesso em: 21 out. 2018.

VULLIAMY, T. J.; KIRWAN, M. J.; BESWICK, R.; HOSSAIN, U.; BAQAI, C.; RATCLIFFE, A.; MARSH, J.; WALNE, A.; DOKAL, I. 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. 1–9, 2011.

VULLIAMY, T. J.; KNIGHT, S. W.; MASON, P. J.; DOKAL, I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 27, n. 2, p. 353–357, 2001.

WALLACE, D. C. Mitochondrial DNA Mutations in Disease and Aging. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 51, n. 3, p. 440–450, 2010.

WALNE, A. J.; VULLIAMY, T.; BESWICK, R.; KIRWAN, M.; DOKAL, I. Mutations in C16orf57 and normal-length telomeres unify a subset of patients with dyskeratosis congenita, poikiloderma with neutropenia and Rothmund-Thomson syndrome. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 22, p. 4453–61, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2957322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 872–884, 1 dez. 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrm3013>. Acesso em: 20 out. 2018.

YAHATA, T.; TAKANASHI, T.; MUGURUMA, Y.; IBRAHIM, A. A.; MATSUZAWA, H.; UNO, T.; SHENG, Y.; ONIZUKA, M.; ITO, M.; KATO, S.; ANDO, K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 118, n. 11, p. 2941–2950, 15 set. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734240>. Acesso em: 21 out. 2018.

YANG, H.; WANG, K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. **Nature Protocols**, v. 10, n. 10, p. 1556–1566, 17 set. 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.105>. Acesso em: 11 jul. 2018.

YOSHIZATO, T.; DUMITRIU, B.; HOSOKAWA, K.; MAKISHIMA, H.; YOSHIDA, K.; TOWNSLEY, D.; SATO-OTSUBO, A.; SATO, Y.; LIU, D.; SUZUKI, H.; WU, C. O.; SHIRAISHI, Y.; CLEMENTE, M. J.; KATAOKA, K.; SHIOZAWA, Y.; OKUNO, Y.; CHIBA, K.; TANAKA, H.; NAGATA, Y.; KATAGIRI, T.; KON, A.; SANADA, M.; SCHEINBERG, P.; MIYANO, S.; MACIEJEWSKI, J. P.; NAKAO, S.; YOUNG, N. S.; OGAWA, S. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 1, p. 35–47, 2 jul. 2015. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1414799>. Acesso em: 20 out. 2018.

YOUNG, N. S. Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 72–77, 2006.

YU, M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. **Life sciences**, v. 89, n. 3–4, p. 65–71, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320511002566%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683715>.

ZIEGLER, D. V; WILEY, C. D.; VELARDE, M. C. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. **Aging cell**, v. 14, n. 1, p. 1–7, fev. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399755>. Acesso

em: 20 out. 2018.

APÊNDICES

Apêndice A – Tabela de características clínicas dos pacientes e suas respectivas variantes somáticas (filtradas)

ID	Sexo	Idade	Telômero	Diagnóstico	Cromossomo	Início	Fim	Func.gene	Gene	Transcrito	Éxon	Alteração no DNA	Alteração na proteina	FreqMaxPop	Cobertura no NGS	Freq Alélica
P01	F	27	normal	AA	chr8	73921321	73921321	exônico	TERF1	NM_003218	exon1	c.200_201insGGCCGA	p.V67delinsVAE	0.0023	151	0.338
P02	M	13	<10º	DC	chr8	73921321	73921321	exônico	TERF1	NM_003218	exon1	c.200_201insGGCCGA	p.V67delinsVAE	0.0023	158	0.361
P03	F	13	<10º	AA	chr9	139411768	139411768	exônico	NOTCH1	NM_017617	exon9	c.G1511A	p.R504H	0.011	44	0.341
P04	M	43	<10º	AA	chrX	15339747	15339752	exônico	PIGA	NM_020473	exon5	c.629_634T		.	257	0.214
					chrX	15339747	15339748	exônico	PIGA	NM_020473	exon5	c.633_634del	p.M211fs	.	381	0.213
					chrX	15339750	15339752	exônico	PIGA	NM_020473	exon5	c.629_631del	p.210_211del	.	378	0.220
					chrX	15349505	15349505	exônico	PIGA	NM_002641	exon2	c.G548A	p.C183Y	.	441	0.050
					chrX	15349562	15349562	exônico	PIGA	NM_002641	exon2	c.C491T	p.S164L	.	416	0.026
					chrX	15343275	15343275	splicing	.					.	312	0.080
P05	M	21	<10º	AA	chr6	33288285	33288285	exônico	DAXX	NM_001254717	exon3	c.G898A	p.V300I	0.02	394	0.378
P06	F	6	<10º	AA	chr3	10138091	10138091	exônico	FANCD2	NM_001018115	exon42	c.A4120G	p.M1374V	0.0002	658	0.175
					chr3	38182272	38182272	exônico	MYD88	NM_001172566	exon2	c.C392G	p.S131C	.	288	0.330
					chr11	6636431	6636431	exônico	TPP1	NM_000391	exon11	c.G1396A	p.V466M	0.013	488	0.293
					chr11	22646984	22646984	exônico	FANCF	NM_022725	exon1	c.G373A	p.D125N	0.014	274	0.292
					chr13	28622419	28622419	exônico	FLT3	NM_004119	exon9	c.G1198A	p.G400R	0.0002	714	0.177
					chr17	56798128	56798128	exônico	RAD51C	NM_058216	exon6	c.A859G	p.T287A	0.015	658	0.176
					chr17	73996233	73996233	exônico	TEN1	NM_001113324	exon4	c.G262A	p.V88M	0.0009	226	0.310
P07	F	26	<1º	AA	chr7	124493042	124493042	exônico	POT1	NM_001042594	exon9	c.G460A	p.V154M	.	343	0.248
P08	F	29	<1º	AA	chr20	61512079	61512080	exônico	DIDO1	NM_001193369	exon16	c.5228_5229GA		.	155	0.394
P09	M	3	<1º	AA	chr2	198274622	198274636	exônico	SF3B1	NM_012433	exon7	c.762_776AACTGTTCTATTCTTAATCTGTCCCCCA		.	440	0.023
					chr4	106196420	106196420	exônico	TET2	NM_001127208	exon11	c.A4753T	p.T1585S	.	544	0.020
					chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insGTGGTG	p.K104fs	.	548	0.141
					chr13	28623878	28623878	exônico	FLT3	NM_004119	exon7	c.775_776insTGATGA	p.Q259_L260delinsLMIQ	.	563	0.025
					chr14	45658348	45658430	exônico	FANCM	NM_001308133	exon19	c.5045_5127CGATGTCTGTTTGCTCTGCTTTGCTA		.	562	0.021
P10	F	55	<1º	AA	chr11	118344185	118344185	exônico	KMT2A	NM_001197104	exon3	c.2312dupC	p.T771fs	0.0005	461	0.026
P11	F	34	<1º	AA	chr15	65108079	65108079	exônico	PIF1	NM_001286497	exon13	c.1935delG	p.W645fs	0.0002	451	0.395
P12	M	24	<1º	DC	chr3	10088285	10088285	exônico	FANCD2	NM_001018115	exon15	c.T1156G	p.F386V	0.015	931	0.128
					chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insGATGTG	p.K104_M105delinsRCGF	.	463	0.073
P13	M	11	<1º	AA	chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insGTGAGG	p.K104fs	.	351	0.117
P14	F	33	<10º	AA	chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insTGGTGA	p.K104delinsMVRRMWI	.	876	0.113
					chr13	32937333	32937333	exônico	BRCA2	NM_000059	exon18	c.A7994G	p.D2665G	0.0011	729	0.148
					chr17	56770057	56770057	exônico	RAD51C	NM_002876	exon1	c.C53T	p.P18L	0	264	0.349
					chr20	62321128	62321128	exônico	RTEL1	NM_001283010	exon23	c.G1382A	p.R461Q	0.018	177	0.170
P15	M	19	<1º	DC	chr7	124493075	124493075	exônico	POT1	NM_001042594	exon9	c.G427C	p.G143R	.	461	0.143
P16	M	7	<1º	DC	chr5	1294779	1294882	exônico	TERT	NM_001193376	exon2	c.220_222del	p.74_74del	.	98	0.367
					chr6	35425714	35425714	exônico	FANCE	NM_021922	exon4	c.923dupC	p.A308fs	0.0038	427	0.026
					chr16	3640985	3640985	exônico	SLX4	NM_032444	exon12	c.C2654T	p.P885L	0.002	393	0.397
					chr17	7606714	7606714	exônico	WRAP53	NM_018081	exon10	c.1558dupG	p.C519fs	0.0078	213	0.052
P17	F	20	<1º	DC	chr15	74315485	74315485	exônico	PML	NM_002675	exon3	c.C919T	p.R307C	0.0025	46	0.391
P18	F	54	normal	AA	chrX	15349685	15349685	exônico	PIGA	NM_002641	exon2	c.367dupA	p.T123fs	.	454	0.066

ID	Sexo	Idade	Telômero	Diagnóstico	Cromossomo	Início	Fim	Func.gene	Gene	Transcrito	Éxon	Alteração no DNA	Alteração na proteina	FreqMaxPop	Cobertura no NGS	Freq Alélica
P19	M	22	normal	AA	chr20	31023097	31023097	exônico	ASXL1	NM_015338	exon12	c.2583dupA	p.A861fs	.	487	0.084
					chrX	15349495	15349497	exônico	PIGA	NM_002641	exon2	c.556_558del	p.186_186del	.	327	0.046
					chrX	15349665	15349666	exônico	PIGA	NM_002641	exon2	c.387_388del	p.S129fs	.	304	0.125
P20	F	51	normal	AA	chrX	15344050	15344050	exônico	PIGA	NM_020473	exon2	c.C132G	p.Y44X	.	824	0.046
					chrX	53431967	53431967	exônico	SMC1A	NM_006306	exon13	c.C2173T	p.R725X	.	522	0.056
P21	F	47	normal	AA	chr18	42456664	42456664	exônico	SETBP1	NM_001130110	exon4	c.675_676insGCTC	p.G225fs	.	528	0.021
P22	F	19	normal	AA	chr2	62099627	62099627	exônico	CCT4	NM_001256721	exon10	c.G1132T	p.A378S	0	483	0.340
					chr3	154032856	154032856	exônico	DHX36	NM_001114397	exon3	c.C582A	p.D194E	0.0052	764	0.309
					chr6	34392888	34392888	exônico	RPS10	NM_001014	exon2	c.C111G	p.D37E	0.0011	375	0.397
					chr9	133759490	133759492	exônico	ABL1	NM_005157	exon11	c.1813_1815del	p.605_605del	0.015	429	0.026
					chr11	6638351	6638351	exônico	TPP1	NM_000391	exon6	c.C542T	p.S181F	0.003	360	0.372
					chr13	32912651	32912651	exônico	BRCA2	NM_000059	exon11	c.T4159A	p.L1387I	.	727	0.169
					chr17	59761111	59761111	exônico	BRIP1	NM_032043	exon20	c.T3296G	p.L1099R	0.0001	784	0.311
P23	M	81	normal	AA	chrX	39913138	39913138	splicing	.					.	339	0.044
P24	F	81	normal	AA	chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insGTGAGG	p.K104fs	.	477	0.078
P25	F	28	normal	AA	chrX	39913508	39913508	splicing	.					.	300	0.043
P26	F	24	normal	AA	chr18	42456671	42456679	exônico	SETBP1	NM_001130110	exon4	c.682_690TCTTACTCTTCC		.	401	0.057
P27	M	20	<1º	AA	chr12	57058282	57058282	exônico	PTGES3	NM_001282605	exon6	c.310_311insTGGTGA	p.K104delinsMVRRMWI	.	461	0.085
P28	M	40	<1º	AA	chr21	44524456	44524456	exônico	U2AF1	NM_001025203	exon2	c.C101T	p.S34F	0.0002	632	0.248
P29	M	39	<1º	AA	chr20	31023373	31023373	exônico	ASXL1	NM_015338	exon12	c.2858_2859insTGAC	p.L953fs	.	639	0.238
	M	39	<1º	AA	chr21	36171600	36171600	exônico	RUNX1	NM_001001890	exon5	c.C884G	p.S295X	.	466	0.253
P30	F	8	<10º	AA	chr20	57429696	57429696	exônico	GNAS	NM_001077490	exon1	c.1189_1190insTGAC	p.L397delinsLTPQPIPTP	.	63	0.365
P31	F	8	<1º	DC	chr20	57429696	57429696	exônico	GNAS	NM_001077490	exon1	c.1189_1190insTGAC	p.L397delinsLTPQPIPTP	.	81	0.333
P32	M	12	<1º	DC	chr9	21974640	21974640	exônico	CDKN2A	NM_058197	exon1	c.G187C	p.G63R	0.006	252	0.369
					chr11	6636520	6636520	exônico	TPP1	NM_000391	exon11	c.T1307C	p.L436P	0.0015	429	0.037
					chr15	43023163	43023163	exônico	CDAN1	NM_138477	exon13	c.C1967G	p.T656S	0.0061	269	0.364
					chr20	61512933	61512933	exônico	DIDO1	NM_001193369	exon16	c.4374_4375insCTGTC	p.R1459_P1460delinsLSL	.	282	0.036
P33	M	4	<1º	DC	chr20	57429696	57429696	exônico	GNAS	NM_001077490	exon1	c.1189_1190insTGAC	p.L397delinsLTPQPIPTP	.	77	0.351
P34	M	2	<1º	DC	chr12	111884765	111884765	exônico	SH2B3	NM_001291424	exon3	c.T248G	p.I83S	.	365	0.030
P35	F	67	normal	AA	chr17	59763272	59763272	exônico	BRIP1	NM_032043	exon19	c.C2830G	p.Q944E	0.003	308	0.033
						154003528	154003528	exônico	DKC1	NM_001142463	exon13	c.G1303A	p.E435K	0.0014	355	0.039
P36	F	30	<10º	AA	chr17	40854536	40854559	exônico	EZH1	NM_001321079	exon20	c.2253_2276ATAAATATAAAAAAACCAGGCCCC		.	411	0.024
P37	M	10	normal	AA	chr3	72897459	72897459	exônico	SHQ1	NM_018130	exon1	c.T33G	p.D11E	0.007	385	0.026
					chr14	24709842	24709842	exônico	TINF2	NM_001099274	exon6	c.C844T	p.R282C	.	497	0.022
					chr19	13050253	13050253	exônico	CALR	NM_004343	exon3	c.A205G	p.S69G	.	444	0.025
					chr21	36164605	36164605	exônico	RUNX1	NM_001001890	exon6	c.T1189G	p.S397A	.	50	0.260
P38	F	18	<1º	AA	chr7	124532330	124532330	exônico	POT1	NM_015450	exon6	c.C114G	p.S38R	.	350	0.051
					chr7	124532331	124532331	exônico	POT1	NM_015450	exon6	c.G113A	p.S38N	.	347	0.262
					chr21	36164605	36164605	exônico	RUNX1	NM_001001890	exon6	c.T1189G	p.S397A	.	59	0.390
P39	M	51	<10º	AA	chr14	45620721	45620721	exônico	FANCM	NM_001308133	exon4	c.C962T	p.P321L	0.008	151	0.351

ID	Sexo	Idade	Telômero	Diagnóstico	Cromossomo	Início	Fim	Func.gene	Gene	Transcrito	Éxon	Alteração no DNA	Alteração na proteina	FreqMaxPop	Cobertura no NGS	Freq Alélica
P40	M	5	normal	AA	chr3	10088285	10088285	exônico	FANCD2	NM_001018115	exon15	c.T1156G	p.F386V	0.015	379	0.111
P41	F	38	normal	AA	chr13	32900405	32900405	exônico	BRCA2	NM_000059	exon6	c.C502A	p.P168T	0	145	0.352
P42	F	15	normal	AA	chr20	57429696	57429696	exônico	GNAS	NM_001077490	exon1	c.1189_1190insTGAC(	p.L397delinsLTPQPIPTP(	.	111	0.351
P43	F	15	normal	AA	chr19	45284301	45284301	exônico	CBLC	NM_001130852	exon2	c.G493A	p.G165R	0.0014	263	0.399
P44	M	14	normal	AA	chr2	62104528	62104532	exônico	CCT4	NM_001256721	exon5	c.550_554del	p.L184fs	.	154	0.091
					chr2	62104533	62104533	exônico	CCT4	NM_001256721	exon5	c.548_549insAAAAA	p.K183fs	.	153	0.092
					chr2	62104541	62104541	exônico	CCT4	NM_001256721	exon5	c.G541A	p.V181I	.	150	0.100
P45	M	23	<10º	AA	chr21	36164610	36164610	exônico	RUNX1	NM_001001890	exon6	c.A1184C	p.E395A	.	49	0.367
P46	M	29	normal	AA	chr18	42531907	42531907	exônico	SETBP1	NM_015559	exon4	c.G2602A	p.D868N	.	319	0.038
P47	F	13	normal	AA	chr2	58386928	58386928	exônico	FANCL	NM_001114636	exon14	c.1114_1115insATTA	p.T372fs	0.0078	109	0.349
P48	F	5	normal	AA	chr2	209110060	209110060	exônico	IDH1	NM_001282386	exon5	c.502_503insCTGTCT(	p.L168_V169delinsPVSX	.	239	0.046
					chr9	133759490	133759492	exônico	ABL1	NM_005157	exon11	c.1813_1815del	p.605_605del	0.015	358	0.034
P49	F	18	<1º	DC	chr3	10088285	10088285	exônico	FANCD2	NM_001018115	exon15	c.T1156G	p.F386V	0.015	351	0.091
					chr9	133759490	133759492	exônico	ABL1	NM_005157	exon11	c.1813_1815del	p.605_605del	0.015	351	0.029
					chr19	49513081	49513081	exônico	RUVBL2	NM_001321190	exon7	c.409_410insCCGAGA	p.I137_Y138delinsTEIYTX	.	367	0.027
P50	M	14	<10º	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P51	F	50	<10º	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P52	M	15	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P53	M	40	<10º	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P54	M	10	<1º	DC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P55	F	42	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P56	M	26	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P57	M	23	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P58	M	27	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P59	M	15	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P60	F	60	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P61	M	22	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P62	M	20	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P63	M	33	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P64	F	52	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P65	M	19	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P66	M	3	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P67	M	26	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P68	F	54	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P69	F	49	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P70	M	9	<1º	DC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P71	M	32	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P72	M	42	normal	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

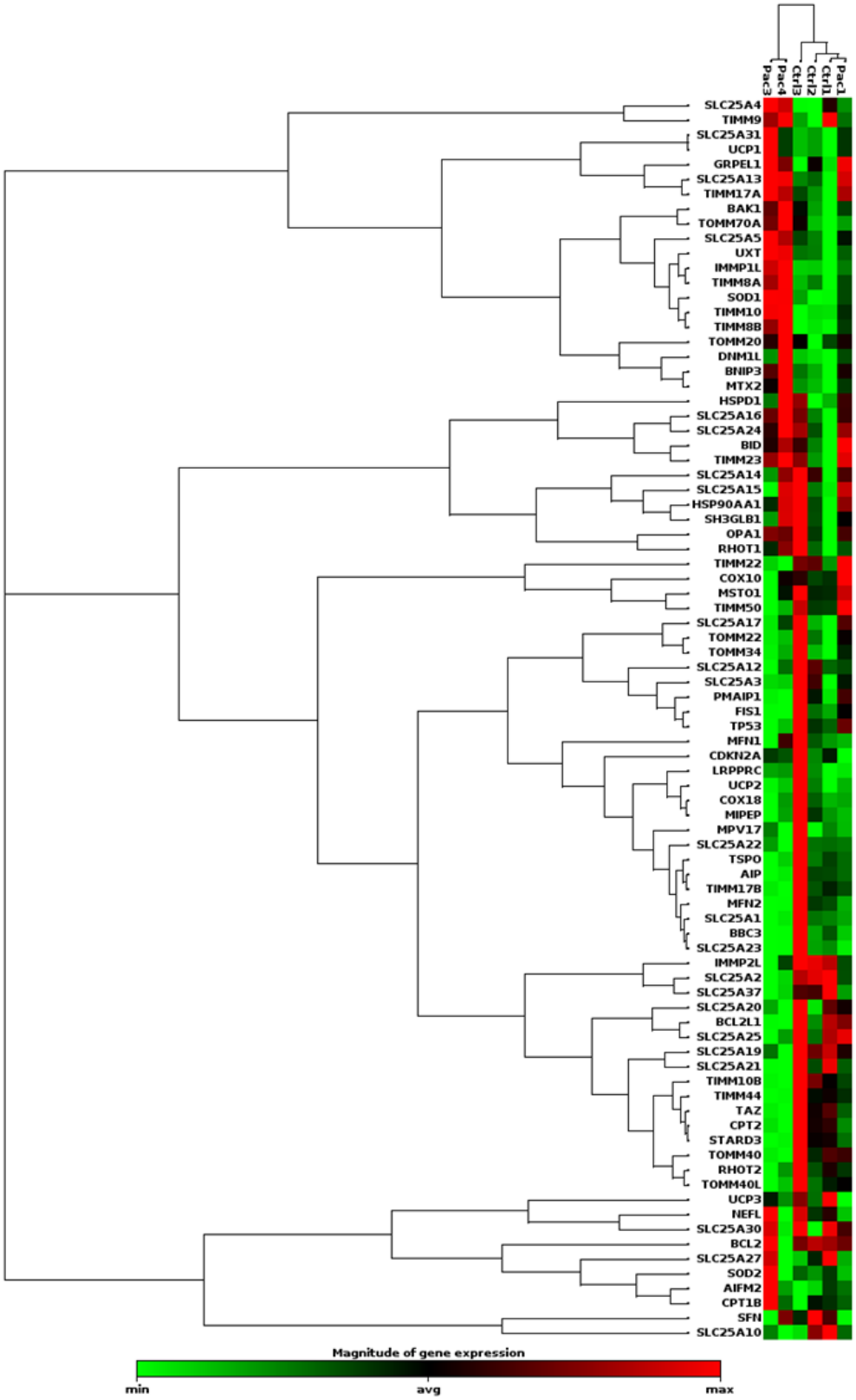
Abreviações: M (masculino), F (feminino), AA (anemia aplástica), DC (disceratose congênita), FeqMaxPop (frequência máxima da variante em diferentes população) e NA (não se aplica).

Apêndice B – Tabela de pacientes e indivíduos saudáveis (controles) usados na quantificação de DNA mitocondrial (mtDNA)

ID	Sexo	Diagnóstico	Gene mutado
P73	M	FP	TERT
P74	F	FP	TERT
P75	M	FP	TERT
P76	M	FP	TERT
P77	M	FP	TERT
P78	F	FP	TERT
P79	F	AA	TERT
P80	M	AA	TINF2
P81	M	AA	TINF2
P82	M	FP	TERT
P83	F	AA	TERT
P84	F	FP	TERT
P85	M	AA	PARN
P86	F	FP	TINF2
P87	M	DC	TERT
P88	M	DC	TINF2
P89	F	DC	RTEL
P90	F	DC	TINF2
P91	F	DC	TINF2
P92	M	DC	TERT
P93	M	DC	TINF2
P94	M	DC	TINF2
P95	M	DC	TINF2
P96	F	DC	TERT
P97	M	FP	TERT
P98	M	DC	DKC1
P99	M	AA	PARN
C01	M	NA	NA
C02	M	NA	NA
C03	M	NA	NA
C04	M	NA	NA
C05	M	NA	NA
C06	M	NA	NA
C07	F	NA	NA
C08	F	NA	NA
C09	F	NA	NA
C10	M	NA	NA
C11	F	NA	NA
C12	F	NA	NA
C13	M	NA	NA
C14	M	NA	NA
C15	M	NA	NA

Abreviações: M (masculino), F (feminino), AA (anemia aplástica), DC (disceratose congênita), FP (fibrose pulmonar) e NA (não se aplica).

Apêndice C - Mapa de calor (*heatmap*) completo.



Heatmap de 84 genes relacionados a biogênese e função mitocondrial. Cada linha representa um gene e cada coluna uma amostra de RNA de fibroblastos. A intensidade do verde é proporcional ao nível de inibição da expressão do RNA e a intensidade do vermelho representa o quão mais expresso o gene está em relação aos genes constitutivos (*B2M* e *RPLP0*

ANEXOS

Anexo 1 – Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 23 de setembro de 2016.

O projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da função mitocondrial em pacientes e camundongos com telomeropatias"**, em nome de André Luiz Pinto Santos, orientada pelo Dr Rodrigo do Tocantins Callado de Saloma Rodrigues, foi avaliado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2016.11-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

RH-I.17 – REV. 1
RUA TEN. CATÃO ROXO º 2501 - CEP 14051-140 - RIBEIRÃO PRETO - SP - PABX: (16) 2101-9300 - FAX: (16) 2101-9309
CNPJ 60.255.791/0001-22 - INSCR. EST.: ISENTA

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em humanos

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 14 de abril de 2016

Ofício nº 1278/2016
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM PACIENTES E CAMUNDONGOS COM TELOMEROPATIAS", - versão 2, de 28/03/2016,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 425ª Reunião Ordinária, realizada em 11/04/2016 e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2, de 27/03/2016 e o Termo de Assentimento – versão 2, de 27/03/2016, de acordo com o Processo HCRP nº 3407/2016.

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

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
ANDRÉ LUIZ PINTO SANTOS
PROF.DR.RODRIGO DO TOCANTINS DE SALOMA RODRIGUES(Orientador)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br
www.hcrp.usp.br