



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

A expressão do TERRA é desregulada na leucemia mieloide aguda

Aluno:

Luiz Fernando Bazzo Catto

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo T. Calado De Saloma Rodrigues

Ribeirão Preto
2022

A expressão do TERRA é desregulada na leucemia mieloide aguda

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, como requisito para obtenção de título de doutor.

Aluno: Luiz Fernando Bazzo Catto

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo T. Calado De Saloma Rodrigues

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.

Catto, Luiz Fernando Bazzo

A expressão do TERRA é desregulada na leucemia mieloide aguda –
Ribeirão Preto, 2022.

94p

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Rodrigues, Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues

1. Telômeros. 2. Telomerase. 3. TERRA. 4. R-loops. 5. leucemia mieloide aguda.

Nome: Catto, Luiz Fernando Bazzo

Título: A expressão do TERRA é desregulada na leucemia mieloide aguda

Banca Examinadora

Julgamento: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Instituição:

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

Área de Concentração: Células-tronco e Terapia Celular

“A estupidez tem o dom de conseguir o que quer; como deveríamos ver se não estivéssemos sempre tão envolvidos em nós mesmos”. (**Albert Camus – A praga**)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo suporte recebido durante todos esses anos, em especial ao meu pai, Luiz Gonzaga Catto, minha mãe, Lucilene Bazzo Catto, minha irmã Marília Bazzo Catto e minha esposa, Flávia Mesquita Gava.

Agradeço ao meu mentor e amigo, Rodrigo T. Calado, por proporcionar oportunidades de crescimento científico e intelectual durante a minha trajetória.

Agradeço aos meus amigos, Flávia S. Donaires, Barbara A. Santana e Diego Villa Clé, pelas orientações, ensinamentos e discussões.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação pelos ensinamentos e projetos realizados durante esses últimos anos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro do CTC/FAPESP nº 2013/08135.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Meus sinceros agradecimentos a todos

Catto, L.F. B. **A expressão do TERRA é desregulada na leucemia mieloide aguda.** Thesis (Doctor of Philosophy). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2022.;

Resumo

Os telômeros compõem as extremidades dos cromossomos lineares e são responsáveis por manter a integralidade genômica. As regiões subtelomérica e teloméricas são transcritas em RNAs longo não codificantes denominados TERRA (*TElomeric Repeat containing RNA*). Os TERRAs formam híbridos de DNA-RNA denominados R-loops e estão envolvidos na manutenção e estabilização do telômero, alongamento telomérico por vias dependentes e independentes da telomerase e controle transcricional. Os R-loops devem ser mantidos em níveis ideais, tanto alto quanto baixos níveis de R-loops estão relacionados a lesão do DNA e encurtamento telomérico. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de TERRA em leucemias mieloides agudas (LMAs). Também foram avaliadas as expressões de genes relacionados a dinâmica telomérica (*TERT*, *TRF2*), controle dos R-loops (*RNaseH1*, *RNaseH2*) e dinâmica da transcrição dos TERRAs (*TRF2*, *ATRX*). A análise por clusterização hierárquica baseada na expressão de TERRA demonstrou que existem dois grupos de LMA, um com alta expressão de TERRA e outro com baixa expressão de TERRA. Ambos os grupos apresentam comprimento telomérico curto, alta expressão de *TRF2*, *RNaseH1* e *ATRX*. O grupo com alta expressão de TERRA apresenta menor expressão de *RNaseH2* ($p < 0,05$), enzima essencial para a diminuição dos R-loops durante a fase S, e de *TERT* ($p < 0,05$). Neste grupo, a baixa expressão de *RNaseH2* pode favorecer o acúmulo de R-loops, aumento da quebra de DNA e a ativação de vias alternativas de alongamento telomérico independente da telomerase. Em relação a caracterização citogenética molecular dos grupos de LMAs, o grupo com alta expressão de TERRA se caracteriza por uma baixa prevalência de mutações em fatores de splicing. Baseado na prevalência dos diferentes subtipos de LMA da nossa coorte, foram selecionadas duas linhagens celulares, NB4, uma linhagem de leucemia promielocítica aguda, e THP1, uma linhagem de leucemia mielomonocítica a fim de estudar a importância dos R-loops na manutenção dessas linhagens. As linhagens foram transduzidas com vetores lentivirais contendo RNaseH1-GFP ou apenas GFP. As linhagens transduzidas com vetor lentiviral RNaseH1-GFP apresentaram alta expressão de RNaseH1 ($p < 0,05$) e maior quimiossensibilidade a citarabina ($p < 0,05$). Este resultado indica que a inibição dos R-loops é um potencial alvo terapêutica nas LMAs.

Palavras-chave: Telômeros, telomerase, TERRA, R-loops, leucemia mieloide aguda

Catto, L.F. B. **TERRA expression is dysregulated in acute myeloid leukemia**. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.;

Abstract

Telomeres compose the ends of linear chromosomes and maintain genomic integrity. The subtelomeric and telomeric regions are transcribed into long non-coding RNAs called TERRA (TELomeric Repeat containing RNA). TERRAs form DNA-RNA hybrids called R-loops and are involved in telomere maintenance and stabilization, telomeric elongation by telomerase-dependent and independent pathways, and transcriptional control. R-loops must be maintained at optimal levels. Both high and low levels of R-loops are related to DNA damage and telomeric shortening. This study aimed to evaluate the expression of TERRA in acute myeloid leukemias (AMLs). The expressions of genes related to telomeric dynamics (TERT, TRF2), R-loops control (RNaseH1, RNaseH2), and TERRA transcriptional dynamics (TRF2, ATRX) were also evaluated. The analysis by hierarchical clustering based on the expression of TERRA revealed two groups of AML, one with high TERRA expression and the other with low TERRA expression. Both groups demonstrated short telomeric length and high expression of TRF2, RNaseH1, and ATRX. The group with high expression of TERRA showed lower expression of RNaseH2 ($p < 0.05$), an enzyme responsible for the reduction of R-loops during the S phase, and of TERT ($p < 0.05$). In this group, the low expression of RNaseH2 may favor the accumulation of R-loops, increased DNA breakage, and activation of alternative telomere lengthening. Regarding the molecular cytogenetic characterization of the AML groups, the group with high expression of TERRA is characterized by a low prevalence of mutations in splicing factors. Based on the prevalence of different AML subtypes in our cohort, two cell lines, NB4, an acute promyelocytic leukemia lineage, and THP1, a myelomonocytic leukemia lineage, were selected to study the importance of R-loops in the maintenance of these lines. NB4 and THP1 were transduced with lentiviral vectors containing RNaseH1-GFP or GFP alone. Cell lines transduced with the lentiviral vector RNaseH1-GFP showed high expression of RNaseH1 ($p < 0.05$) and greater chemosensitivity to cytarabine ($p < 0.05$). This result indicates that inhibition of R-loops is a potential therapeutic target in AMLs.

Keywords: Telomere, telomerase, TERRA, R-loops, acute myeloid leukemia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura do telômero	8
Figura 2. Representação esquemática do limite de Hayflick	10
Figura 3. Representação da telomerase e outras enzimas que auxiliam sua função	10
Figura 4. Esquema representando a relação entre encurtamento telomérico e a tumorigênese	11
Figura 5. Transcrição dos TERRAs a partir das ilhas CpG	19
Figura 6. Localização dos TERRAs com e sem cauda poli-A	19
Figura 7. Representação da estrutura das ilhas CpG dos TERRAs	20
Figura 8. Esquema demonstrando as densidades das ilhas CpG nos diferentes cromossomos	20
Figura 9. Representação do encurtamento telomérico em pacientes com ICF 1	21
Figura 10. Genes regulados mediante a interação entre TERRA e ATRX	24
Figura 11. Esquema demonstrando as funções do TERRA	25
Figura 12. Análise da expressão de TERRAs, TERT, TRF2, atividade da telomerase (TRAP), comprimento telomérico e quantificação de R-loops em diferentes doenças hematológicas. Dados provenientes Zanelatto, Leonardo Campos. Expressão do RNA teloméricos não-codificante TERRA em leucemias agudas e telomeropatias. Ribeirão Preto, 2019.	27
Figura 13. Imagem da eletroforese em gel de agarose demonstrando as sequências da RNaseH1-GFP e GFP	42
Figura 14. Gel de agarose dos plasmídeos lentivirais clonados após inserção das sequências RNaseH1-GFP e GFP	43
Figura 15. Imagem demonstrando que as linhagens celulares foram transduzidas de modo eficaz	44

Figura 16. Análise por clusterização hierárquica não supervisionada utilizando a distância euclidiana das LMAs	61
Figura 17. Análise das expressões de TERRA nos dois subgrupos de LMA	62
Figura 18. Distribuição das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas na coorte de LMA	63
Figura 19. Distribuição das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas em genes de fatores de splicing e de reguladores epigenéticos nos dois subgrupos de LMA	63
Figura 20. Gráfico demonstrando a distribuição da estratificação de risco pelo ELN2017 em relação aos dois subgrupos de LMA	64
Figura 21. Gráfico mostrando a expressão de TERT, TRF2, ATRX, RNaseH1, RNaseH2 em relação aos dois subgrupos de LMA	65
Figura 22. Gráfico exibindo a expressão dos genes nas linhagens celulares transduzidas	66
Figura 23. Imagens representativas das linhagens transduzidas e gráfico demonstrando a intensidade do S9.6 (R-loops) no núcleo	67
Figura 24. Gráfico indicando os IC50 para citarabina nas linhagens transduzidas	68
Figura 25. Imagem demonstrando hipóteses sobre os resultados deste estudo	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da LMA conforme a OMS 2017	13
Tabela 2. Classificação de LMA pelo ICC com as percentagens de blastos necessárias para o diagnóstico	14
Tabela 3. Estratificação de risco das LMAs de acordo com o grupo ELN	15
Tabela 4. Lista de reagentes utilizados durante o tratamento com DNase I	45
Tabela 5. Lista de reagentes no RT-PCR para TERRA	46
Tabela 6. Programa no termociclador para RT-PCR TERRA	46

Tabela 7. Lista de reagentes do qPCR para TERRA	47
Tabela 8. Programa no termociclador para qPCR TERRA	47
Tabela 9. Lista de reagentes do RT-PCR para TERT, TRF2, ATRX, RNaseH1 e RNaseH2	48
Tabela 10. Programa no termociclador para RT-PCR (TERT, TRF2, ATRX, RNaseH1 e RNaseH2)	49
Tabela 11. Lista de reagentes do qPCR para TERT, TRF2, ATRX, RNaseH1 e RNaseH2	49
Tabela 12. Programa no termociclador para qPCR TERT, TRF2, ATRX, RNaseH1 e RNaseH2	50
Tabela 13. Lista de reagentes do qPCR para comprimento telomérico	52
Tabela 14. Programa no termociclador para qPCR comprimento telomérico	52
Tabela 15. Lista de genes/éxons sequenciados	53
Tabela 16. Lista de reagentes da reação de Sanger	54
Tabela 17. Programa no termociclador para sequenciamento por Sanger	55
Tabela 18. Principais características dos pacientes com LMA incluídos	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
5. RESULTADOS	57
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	74
8. BIBLIOGRAFIA	76

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Os telômeros

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas que compõem as extremidades dos cromossomos lineares (figura 1). Em mamíferos, o DNA telomérico é formado por milhares de repetições de seis nucleotídeos, 5'-TTAGGG-3'. Associado a essas sequências de DNA, encontra-se o telossomo, complexo constituído pelas proteínas TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 e TPP1 (CALADO; YOUNG, 2009; LIM; CECH, 2021).

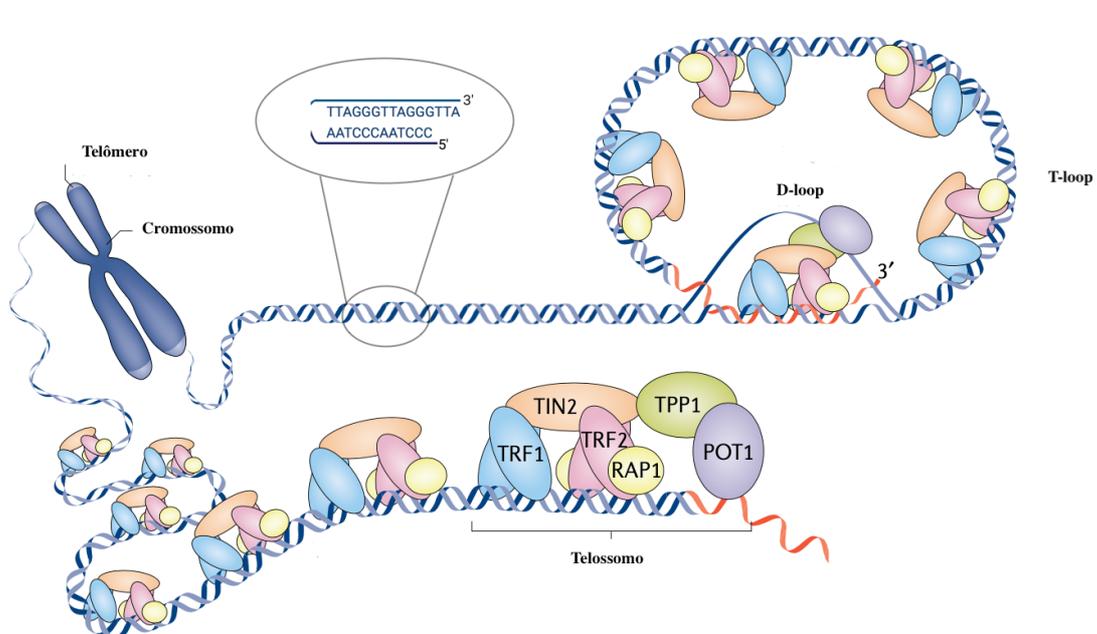


Figura 1. Estrutura do telômero (adaptado de LIM;CECH, 2021)

Os telômeros promovem a integralidade dos cromossomos lineares. O telossomo protege a extremidade livre de DNA telomérico. Caso isso não ocorresse, o DNA telomérico seria reconhecido como uma lesão na dupla fita de DNA, promovendo a ativação das vias de reparo (DE LANGE, 2005; LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016; PALM; DE LANGE, 2008). Em células de mamíferos, as lesões de dupla fita de DNA são reparadas através de duas vias: 1) NHEJ (do inglês, *nonhomologous end joining*) e 2) HDR (do inglês, *homologous direct repair*). O telossomo e a formação de T-loops, um arranjo em laço do final do DNA telomérico, protegem os telômeros dessas vias de reparo do DNA, que poderiam promover fusão de DNA entre diferentes cromossomos (DE LANGE, 2004).

Os telômeros mantêm a estabilidade dos cromossomos lineares. Em células

de mamíferos, as lesões de dupla fita do DNA são reconhecidas através da via ATM e as lesões de fita única do DNA são reconhecidas através da via ATR. Essas vias, quando ativadas, promovem bloqueio do ciclo celular, impedindo a proliferação celular, ou deflagram apoptose. A proteína TFR2 inibe a via ATM, enquanto que a proteína POT1 inibe a via ATR (PALM; DE LANGE, 2008).

Por fim, os telômeros protegem contra a perda de material genético decorrente da duplicação da fita de DNA durante a fase S. Essa proteção não é perfeita e o telômero se encurta a cada divisão celular. Em um cromossomo linear, as fitas de DNA são replicadas a partir de *primers* de RNA. Quando o *primer* de RNA é retirado, ocorre a formação de uma lacuna, onde a DNA polimerase não consegue estender mais a fita de DNA, gerando uma fita mais curta, a cada ciclo de divisão (GUTIERREZ-RODRIGUES; SANTANA-LEMO; SCHEUCHER; ALVES-PAIVA *et al.*, 2014; OLOVNIKOV, 1973). Este mecanismo é denominado problema de replicação final (DE LANGE, 2009).

O encurtamento telomérico explica a finita capacidade de divisão/proliferação das células humanas em cultura, fenômeno denominado de “limite de Hayflick” (BLASCO, 2007; SHAY; WRIGHT, 2000). Quando os telômeros encontram-se criticamente encurtados, os mesmos sinalizam a parada do ciclo celular, senescência e apoptose (figura 2) (CALADO; YOUNG, 2009; SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022).

A telomerase é uma holoenzima capaz de mitigar os efeitos do encurtamento telomérico a cada divisão em células-tronco, células germinativas e em algumas células somáticas com alta capacidade proliferativa (CALADO; YOUNG, 2009). O complexo da telomerase é constituído por uma transcriptase reversa, TERT, que usa um molde de RNA, TERC, para a síntese de novas sequências de DNA telomérico. O complexo catalítico TERT-TERC se associa a proteínas auxiliares, NOP10, discerina, GAR e NHP2, que fornecem estabilidade, aumentam a função catalítica da enzima, além de auxiliar na interação com o DNA telomérico (figura 3) (GHANIM; FOUNTAIN; VAN ROON; RANGAN *et al.*, 2021; ROAKE; ARTANDI, 2020; TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2014).

que a proliferação continua a despeito do encurtamento crítico dos telômeros, a função protetora do mesmo se torna ineficaz. A presença de extremidades cromossômicas desprotegidas promovem a crise telomérica, fenômeno caracterizado por instabilidade cromossômica, com formação de fusões, translocações e ampliações, além de cromotripsia e *kataegis* (MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017; MATHON; LLOYD, 2001; SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022; VON MORGEN; MACIEJOWSKI, 2018). A reativação da telomerase ou a promoção do alongamento telomérico por vias alternativas à telomerase possibilitam a evasão celular da crise telomérica, o que pode promover a formação de uma célula cancerígena com genoma intensamente rearranjado (figura 4) (VON MORGEN; MACIEJOWSKI, 2018).

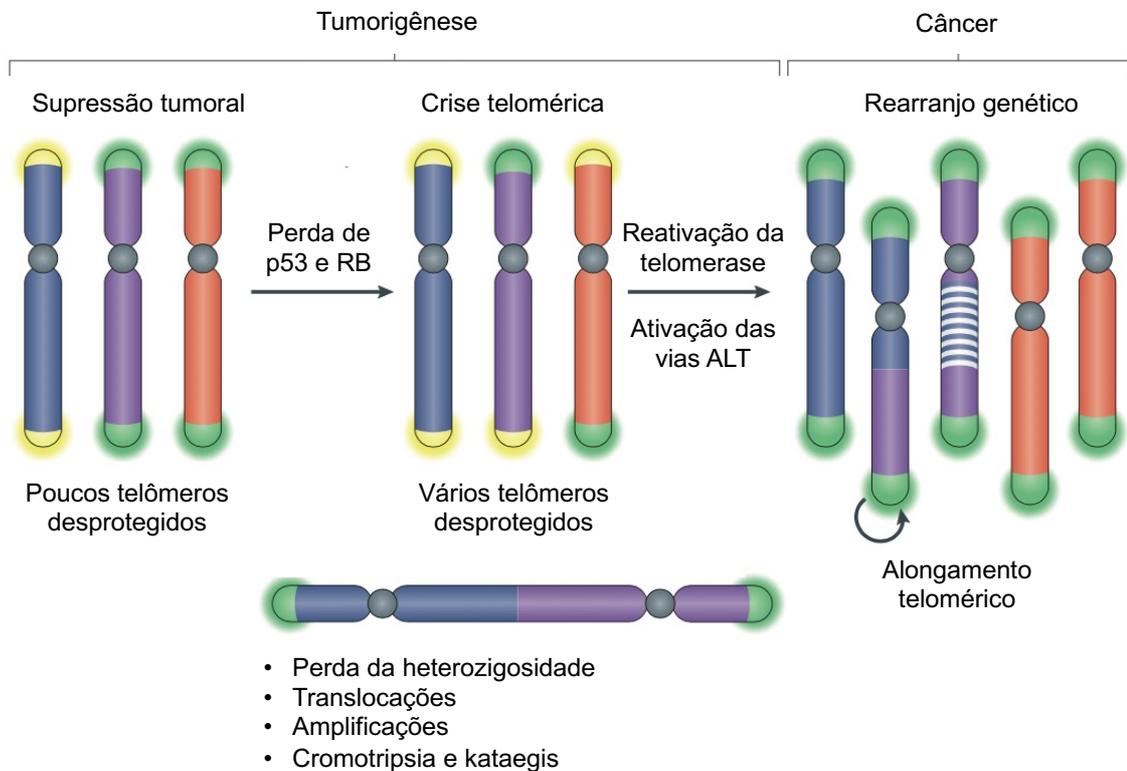


Figura 4. Tumorigênese. Processo de encurtamento telomérico, crise telomérica e estabilização do telômero após reativação da telomerase ou de vias alternativas, ALT (do inglês *alternative lengthening of telomeres*). Adaptado de VON MORGEN; MACIEJOWSKI, 2018)

1.3 Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença clonal caracterizada pela infiltração da medula óssea, sangue e outros tecidos por células progenitoras hematopoiéticas anormais (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015).

A LMA possui uma incidência ajustada para idade de 4,3/100.000 habitantes/ano nos EUA. É uma doença que afeta predominantemente pacientes idosos; possui uma incidência ajustada para idade acima dos 65 anos de 20,1/100.000/ano em comparação a 2,0/100.000/ano para indivíduos com idade inferior a 65 anos. A incidência é maior em homens do que mulheres e maior em caucasianos em comparação a outras etnias (SASAKI; RAVANDI; KADIA; DINARDO *et al.*, 2021; SHALLIS; WANG; DAVIDOFF; MA *et al.*, 2019).

A LMA é uma doença com alta morbidade e mortalidade, sobretudo nos pacientes acima de 65 anos. Nos EUA, o diagnóstico de LMA em pacientes nesta faixa etária está relacionada a pior sobrevida global por tipo de câncer, com quase 80% de mortalidade em 1 ano (SHALLIS; WANG; DAVIDOFF; MA *et al.*, 2019).

A classificação da LMA é baseada em critérios morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares. A classificação utilizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017 (tabela 1) foi recentemente atualizada por um consórcio internacional de classificação (ICC) de neoplasias mieloides (tabela 2) (ARBER; ORAZI; HASSERJIAN; THIELE *et al.*, 2016; ARBER; ORAZI; HASSERJIAN; BOROWITZ *et al.*, 2022).

A classificação mais atual mantém muitos dos subtipos previamente definidos na classificação da OMS em 2017. Dentre as principais modificações, destacam-se a incorporação de novos subtipos de LMA definidos por alterações citogenéticas recorrentes e o estabelecimento de um ponto de corte de $\geq 10\%$ de blastos para a maioria das LMA com alterações citogenéticas recorrentes. Por fim, a presença de neoplasia mielóide prévia (síndrome mielodisplásica ou síndrome mielodisplásica/síndrome mieloproliferativa) ou predisposição germinativa anteriormente definia entidades específicas de LMA; atualmente, essas associações são utilizadas como qualificadores para o diagnóstico (ARBER; ORAZI; HASSERJIAN; BOROWITZ *et al.*, 2022).

Tabela 1. Classificação da LMA pela OMS 2017.

<p>Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas recorrentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • LMA com t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i> • LMA com inv(16)(p13.1q22 ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i> • Leucemia Promielocítica Aguda com <i>PML::RARA</i> • LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A::MLLT3</i> • LMA com t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK::NUP214</i> • LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> • LMA com t(1;22)(p13.3;q13.1); <i>RBM15::MKL1</i> • LMA com <i>BCR::ABL1</i> • LMA com <i>NPM1</i> mutado • LMA com mutação bialélica do <i>CEBPA</i> • LMA com <i>RUNX1</i> mutado
<p>Leucemia mieloide aguda com alterações relacionadas a mielodisplasia</p>
<p>Leucemia mieloide aguda não especificada</p> <ul style="list-style-type: none"> • LMA com diferenciação mínima • LMA sem maturação • LMA com maturação • Leucemia mielomonocítica aguda • Leucemia monoblástica ou monocítica aguda • Leucemia eritroide pura • Leucemia megacarioblástica aguda • Leucemia basofílica aguda • Panmielose aguda com mielofibrose
<p>Sarcoma mieloide</p>
<p>Proliferações mieloides relacionadas a síndrome de Down</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mielopoiese anormal transitória • Leucemia mieloide associada a síndrome de Down

Tabela 2. Classificação de LMA pelo ICC com as percentagens de blastos necessárias para o diagnóstico.

<p>Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas recorrentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • LMA com t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i>; ≥ 10% • LMA com inv(16)(p13.1q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB-MYH11</i>; ≥ 10% • Leucemia promielocítica aguda com <i>PML::RARA</i>; ≥ 10% • Leucemia promielocítica aguda com outros rearranjos do <i>RARA</i>*; ≥ 10% • LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i>; ≥ 10% • LMA com outros rearranjos do <i>KMT2A</i>†; ≥ 10% • LMA com t(6;9)(p23;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i>; ≥ 10% • LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2;MECOM(EV11)</i>; ≥ 10% • LMA com outros rearranjos do <i>MECOM</i>; ≥ 10% • LMA com outras translocações recorrentes raras‡; ≥ 10% • LMA com t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i>; ≥ 20% • LMA com <i>NPM1</i> mutado; ≥ 10% • LMA com mutação in-frame do bZIP do <i>CEBPA</i>; ≥ 10% • LMA com mutação do <i>TP53</i>; ≥ 20%
<p>LMA com anormalidades citogenéticas relacionadas a mielodisplasia; ≥ 20%</p> <p>LMA com mutações genéticas relacionadas a mielodisplasia; ≥ 20%</p>
<p>Leucemia Mielóide Aguda não especificada; ≥ 20%</p>
<p>Sarcoma mieloide</p>

*Incluem LMAs com t(1;17)(q42.3;q21.2)/*IRF2BP2::RARA*; t(5;17)(q35.1;q21.2)/*NPM1::RARA*; t(11;17)(q23.2;q21.2)/*ZBTB16::RARA*; inversão críptica(17q) ou del(17)(q21.2q21.2)/*STAT5B::RARA*, *STAT3::RARA*; Outros genes raramente rearranjados com o *RARA*: *TBL1XR1* (3q26.3), *FIP1L1* (4q12), *BCOR* (Xp11.4).

† Incluem LMAs com t(4;11)(q21.3;q23.3)/*AFF1::KMT2A*

#; t(6;11)(q27;q23.3)/*AFDN::KMT2A*; t(10;11)(p12.3;q23.3)/*MLLT10::KMT2A*; t(10;11)(q21.3;q23.3)/*TET1::KMT2A*; t(11;19)(q23.3;p13.1)/*KMT2A::ELL*; t(11;19)(q23.3;p13.3)/*KMT2A::MLLT1* (predominante na população infantil).

‡ Incluem LMAs com t(2;3)(p11.5;q26.2)/*MECOM::?*; t(3;8)(q26.2;q24.2)/*MYC,MECOM*; t(3;12)(q26.2;p13.2)/*ETV6::MECOM*; t(3;21)(q26.2;q22.1)/*MECOM::RUNX1*.

O tratamento da LMA é baseado na estratificação de risco. A principal estratificação de risco é definida pela Rede Europeia de Leucemia (ELN, do inglês, *European Leukemia Net*), que utiliza as alterações genéticas e moleculares para classificação de risco nas LMAs. A estratificação de risco das LMAs pelo ELN foi recentemente atualizada (tabela 3)

(DÖHNER; ESTEY; GRIMWADE; AMADORI *et al.*, 2017; DÖHNER; WEI; APPELBAUM; CRADDOCK *et al.*, 2022).

Tabela 3. Estratificação de risco das LMAs de acordo com o grupo ELN

Risco	ELN 2017 (Anormalidades genéticas)	ELN 2022 (Anormalidades genéticas)
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1);/RUNX1::RUNXIT1; inv(16)(p13.1q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11; NPM1 mutado sem mutação do FLT3- ITD ou FLT3-ITD mutado com baixa carga alélica*; mutação bialélica do CEBPA.	t(8;21)(q22;q22.1);/RUNX1::RUNXIT1†; inv(16)(p13.1q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11†; NPM1 mutado sem mutação do FLT3- ITD†§; mutação in-frame do bZIP do CEBPA.
Intermediário	NPM1 mutado com mutação do FLT3- ITD com alta carga alélica*; NPM1 selvagem sem mutação do FLT3- ITD ou FLT3-ITD mutado com baixa carga alélica*; t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A; outras anormalidades genéticas e/ou moleculares não classificadas como favorável ou adversa.	NPM1 mutado com mutação do FLT3- ITD†§; NPM1 selvagem com mutação do FLT3- ITD; t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A; outras anormalidades genéticas e/ou moleculares não classificadas como favorável ou adversa.
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1)/DEK::NUP214; t(v;11q23.3)/KMT2A rearranjado; t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1; inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2;MECOM(EVI I); -5, ou del(5q); -7; -17/abn(17p); Cariótipo complexo ou monossômico; NPM1 selvagem com FLT3-ITD mutado com alta carga alélica*; Mutação do ASXL1, RUNX1 ou TP53.	t(6;9)(p23;q34.1)/DEK::NUP214; t(v;11q23.3)/KMT2A rearranjado; t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1; inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2;MECOM(EVI I); t(3q;26.2;v)/MECOM(EVII) rearranjado; -5, ou del(5q); -7; -17/abn(17p); Cariótipo complexo** ou monossômico††; Mutação do ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 e/ou ZRSR2‡; Mutação do TP53‡‡.

* Baixa carga alélica (<0,5); alta carga alélica (≥0,5)

† Mutações nos genes KIT e/ou FLT3 não alteram a classificação de risco;

§ LMAs com *NPM1* mutado e alterações citogenéticas de risco adverso devem ser categorizadas como risco adverso;

** Cariótipo complexo: ≥ 3 anormalidades cromossômicas não relacionadas na ausência de outra alteração citogenética definidora; exclui cariótipos hiperdiploides com 3 ou mais trissomias sem alterações estruturais.

†† Cariótipo monossômico: presença de ≥ 2 monossomias distintas (excluindo perda do X e Y), ou uma única monossomia em combinação com pelo menos uma outra anormalidade estrutural (excluindo LMAs com (8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 e inv(16)(p13.1q22 ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11);

‡ Não devem ser utilizados como marcadores de risco adverso na co-ocorrência com alterações citogenéticas de risco favorável;

‡‡ TP53 mutado com fração do alelo variante $\geq 10\%$; independentemente da presença de mutação mono- ou bi-alelica; TP53 mutado está muito associado a cariótipo complexo e monossômico.

O tratamento da LMA não foi modificado substancialmente nas últimas décadas e é baseado na combinação de antracíclicos e antimetabólitos. A terapia da LMA pode ser dividida em duas fases: indução de remissão e consolidação. A indução de remissão é baseada na combinação de daunorrubicina e citarabina (esquema 3+7) ou na combinação de idarrubicina, fludarabina, citarabina e G-CSF (esquema FLAG-Ida) e tem por objetivo atingir resposta completa ($< 5\%$ de blastos na medula óssea) com resgate da hematopoese normal. A consolidação é baseada principalmente em doses intermediárias de citarabina e tem por objetivo extinguir células leucêmicas remanescentes. Pacientes com risco de recaída $\geq 35\%$ devem ser submetidos a transplante de medula óssea alogênico. Esses pacientes incluem os com risco favorável ou intermediário com doença residual mínima positiva, e aqueles com risco adverso (DÖHNER; ESTEY; GRIMWADE; AMADORI *et al.*, 2017; DÖHNER; WEI; APPELBAUM; CRADDOCK *et al.*, 2022).

1.4 Biologia dos telômeros na leucemia mieloide aguda

As células-tronco e progenitoras hematopoéticas (CTPH) possuem atividade de telomerase. Os telômeros das CTPH da medula óssea, assim como de outras células saudáveis, encurtam-se durante o processo de divisão celular. Os telômeros das CTPH de adultos são mais curtos quando comparados aos telômeros das CTHP provenientes de cordão umbilical ou fígado fetal (LANSDORP, 2008; YAMAGUCHI; CALADO; LY; KAJIGAYA *et al.*, 2005).

A perda gradativa dos telômeros está associada à idade e à alta capacidade proliferativa das CTPH (GUTIERREZ-RODRIGUES; SANTANA-LEMONS; SCHEUCHER; ALVES-PAIVA *et al.*, 2014). Quando criticamente curtos nas CTPH, os telômeros podem desencadear a imunossenescência, hematopoese ineficaz e aumento do risco de evolução clonal e, conseqüentemente, transformação maligna (ARMANIOS, 2022; KASZUBOWSKA, 2008;

TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2014). Além disso, podem desencadear crise telomérica, com grande instabilidade genômica e formação de anormalidades genéticas estruturais. Posteriormente, a reativação da telomerase ou a ativação do alongamento telomérico por vias alternativas à telomerase nas CTPH pode promover a formação de um clone leucêmico (MATHON; LLOYD, 2001; VON MORGEN; MACIEJOWSKI, 2018).

O comprimento telomérico de pacientes com LMA é mais curto quando comparado à população saudável, tanto em pacientes adultos quanto pediátricos (AALBERS; CALADO; YOUNG; ZWAAN *et al.*, 2013; CAPRARO; ZANE; PONCET; PEROL *et al.*, 2011; DRATWA; WYSOCZAŃSKA; BUTRYM; ŁACINA *et al.*, 2021; EL BELBESY; EL AGGAN; SULTAN; EL NAGGAR *et al.*, 2015; HARTMANN; BRÜMMENDORF; BALABANOV; THIEDE *et al.*, 2005). Em pacientes adultos com LMA, o comprimento telomérico é menor naqueles com LMAs com alterações citogenéticas quando comparados aos pacientes com LMAs sem alterações citogenéticas (CAPRARO; ZANE; PONCET; PEROL *et al.*, 2011; HARTMANN; BRÜMMENDORF; BALABANOV; THIEDE *et al.*, 2005). Em contraste, na população pediátrica não houve diferença no comprimento telomérico em relação a presença e/ou quantidade de alterações citogenéticas (AALBERS; CALADO; YOUNG; ZWAAN *et al.*, 2013).

Em relação ao perfil mutacional nas LMAs, mutações nos genes *IDH1* e/ou *IDH2* estão associadas a maiores comprimentos teloméricos. Adicionalmente, mutações em fatores de regulação epigenética (*IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *DNMT3A* e *TET2*) parecem estar associadas a maiores comprimentos teloméricos. Em contraste, mutações nos genes *FLT3* e *WT1* estão associadas a comprimentos teloméricos mais curtos (WATTS; DUMITRIU; HILDEN; KISHTAGARI *et al.*, 2016).

A atividade da telomerase encontra-se aumentada na maioria dos pacientes com LMAs quando comparada a controle saudáveis. A atividade da telomerase é proporcional à expressão de *TERT* e é maior ao diagnóstico e progressão do que na remissão de doença (EL BELBESY; EL AGGAN; SULTAN; EL NAGGAR *et al.*, 2015).

Os níveis da telomerase em neoplasias podem estar elevados devido a mutações na região promotora do *TERT*, amplificação do *TERT* ou superexpressão de genes que aumentam a atividade da telomerase. Nas LMAs, a presença da mutação do promotor de *TERT* ou a hipometilação do mesmo pode explicar, em alguns casos, o aumento da atividade da telomerase. Contudo, a compreensão dos mecanismos de aumento da atividade da telomerase em LMAs ainda é escassa (CALADO; REGAL; HILLS; YEWDELL *et al.*, 2009; LEE; LEÃO; KOMOSA; GALLO *et al.*, 2019).

Por fim, nas LMAs, embora exista a correlação entre atividade da telomerase e o nível de expressão de *TERT*, não há correlação entre os níveis de telomerase e o comprimento telomérico (CALADO; REGAL; HILLS; YEWDELL *et al.*, 2009; LEE; LEÃO; KOMOSA; GALLO *et al.*, 2019).

1.5 TERRA (*telomeric repeat containing RNA*)

Até recentemente, acreditava-se que a região telomérica e subtelomérica eram transcricionalmente inativas, devido à baixa densidade gênica e por estarem localizadas em uma região de heterocromatina. Este conceito foi modificado em 2007, com a descoberta do TERRA (*TElomeric Repeat-containing RNA*), um RNA longo não-codificante transcrito a partir de regiões subteloméricas e teloméricas (AZZALIN; REICHENBACH; KHORIAULI; GIULOTTO *et al.*, 2007).

Moléculas de TERRA foram descritas em diversos organismos, incluindo leveduras, peixe-zebra, camundongos e humanos (AZZALIN; LINGNER, 2008; CUSANELLI; CHARTRAND, 2014). Em mamíferos, TERRAs são transcritos pela RNA polimerase II (RNAPII) a partir de regiões subteloméricas em direção à região telomérica (SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A., 2008). Logo, os TERRAs são compostos por sequências de RNA subtelomérico seguidas por repetições em tandem de 6 nucleotídeos (5'-UUAGGG-3') e variam de 200 pares de bases (pb) a >10 quilobases (AZZALIN; REICHENBACH; KHORIAULI; GIULOTTO *et al.*, 2007).

A maioria das moléculas de TERRA possuem um *cap* de 7-metilguanossina (m7G) em sua extremidade 5', indicando que são determinadas transcricionalmente e não resultam de modificações pós-transcricionais (FEUERHAHN; IGLESIAS; PANZA; PORRO *et al.*, 2010). O *cap* de m7G provavelmente protege os TERRAs da ação 5'-3' de exonucleases (GONATOPOULOS-POURNATZIS; COWLING, 2014).

Em relação à presença de modificações pós transcricionais, apenas 10% dos TERRAs possuem cauda poli(A) na porção 3' humanos, ao passo que a maior parte das moléculas de TERRAs em leveduras as contêm (figura 5) (FEUERHAHN; IGLESIAS; PANZA; PORRO *et al.*, 2010; LUKE; PANZA; REDON; IGLESIAS *et al.*, 2008).

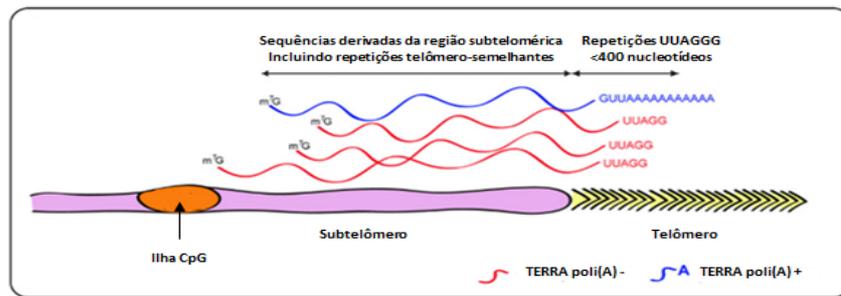


Figura 5. Transcrição do TERRA a partir das Ilhas CpG em direção à região telomérica e composição das moléculas de TERRA (adaptado de FEUERHAHN et al., 2010).

A presença da cauda poli(A) pode estar relacionada a diferentes funções do TERRA (figura 6). TERRAs sem a cauda poli(A) se associam às regiões teloméricas e estão envolvidos na regulação do comprimento, replicação e modificação da composição da cromatina telomérica. Já os TERRAs com a cauda poli(A) ficam livres no nucleoplasma e estão envolvidas na regulação da expressão gênica, sobretudo mediante a interação com ATRX (figura 6) (FEUERHAHN; IGLESIAS; PANZA; PORRO *et al.*, 2010).

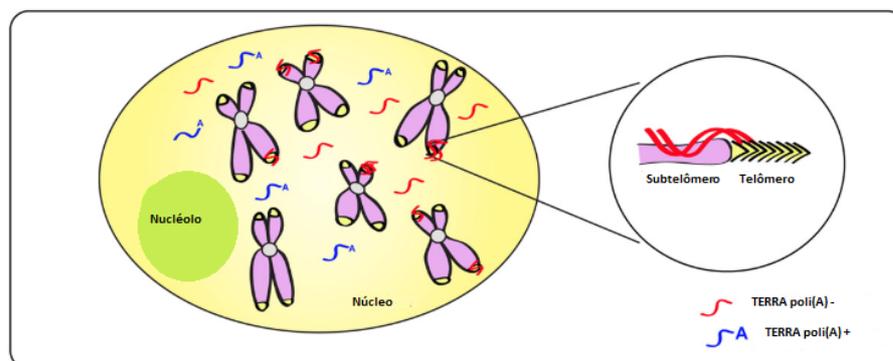


Figura 6. Localização dos TERRAs poli(A)+ e poli(A)- (adaptado de FEUERHAHN et al., 2010).

A expressão do TERRA é regulada a partir de ilhas CpG, regiões de DNA conservadas ricas em guanina e citosina, dentro das regiões subteloiméricas. No TERRA, as ilhas CpG são denominadas de “repetições 61-29-37” e estão organizadas em três diferentes intervalos de DNA. O primeiro e mais próximo ao centrômero contém repetições em tandem de 61 pb. O segundo, discretamente distal, possui repetições em tandem de 29 pb; o terceiro, mais próximo ao telômero, possui repetições em tandem de 37 pb (figura 7) (NERGADZE; FARNUNG; WISCHNEWSKI; KHORIAULI *et al.*, 2009).

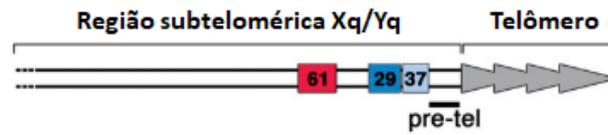


Figura 7: Esquema demonstrando as “repetições 61-29-37” (adaptado de NERGADZE et al., 2009).

A densidade de citosinas e guaninas, e o tamanho das ilhas CpG são variáveis conforme a região subtelomérica. Os cromossomos 10q, 15q, XqYq possuem alta densidade de ilhas CpG; o cromossomo 20q possui uma pequena ilha CpG, e os cromossomos 7p, 17p e XpYp não possuem ilhas CpG (figura 8) (FERETZAKI; RENCK NUNES; LINGNER, 2019; TOUBIANA; GAGLIARDI; PAPA; MANCO *et al.*, 2019; TOUBIANA; SELIG, 2020).

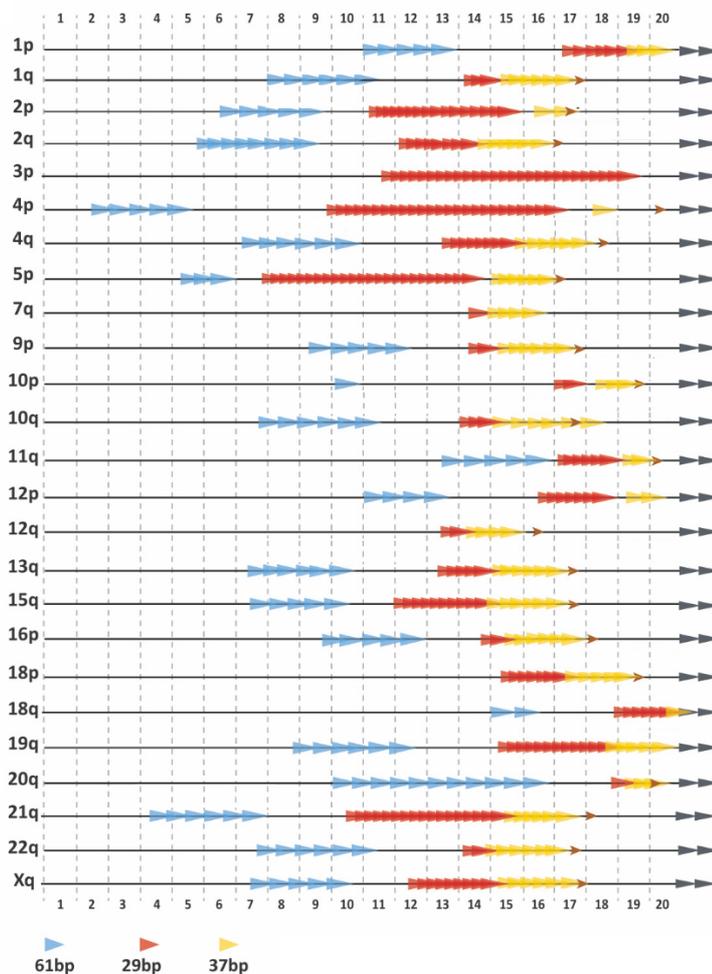


Figura 8. Esquema demonstrando as “repetições 61-39-37” nos diferentes cromossomos. Maior densidade de setas indica maior quantidade de citosina e guaninas (adaptado de TOUBIANA; GAGLIARDI; PAPA; MANCO *et al.*, 2019).

A metilação das ilhas CpG no TERRA são controladas pela enzima DNMT3B. Quando as repetições 61-29-37 estão desmetiladas ou quando há deficiência de DNMTs, existe aumento da transcrição de TERRA em subgrupos de cromossomos que contém ilhas CpG (TOUBIANA; GAGLIARDI; PAPA; MANCO *et al.*, 2019).

A maioria dos promotores de TERRA são hipermetilados pela DNMT3B durante o início do desenvolvimento embrionário. Por consequência, existe baixa expressão de TERRA em células saudáveis. Pacientes com ICF tipo I (ICF, do inglês, *immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies*) possuem mutação germinativa bialélica do *DNMT3B* e, consequentemente, suas células possuem regiões subteloôméricas hipometiladas. A expressão de TERRA em células de pacientes com ICF é muito maior quando comparada a controles saudáveis. As moléculas de TERRA formam híbridos de RNA:DNA nas regiões teloméricas de pacientes com ICF, provocando dano no DNA, perda de DNA telomérico e, conseqüente, encurtamento do telômero (figura 9) (SAGIE; TOUBIANA; HARTONO; KATZIR *et al.*, 2017; TOUBIANA; SELIG, 2018; 2020).

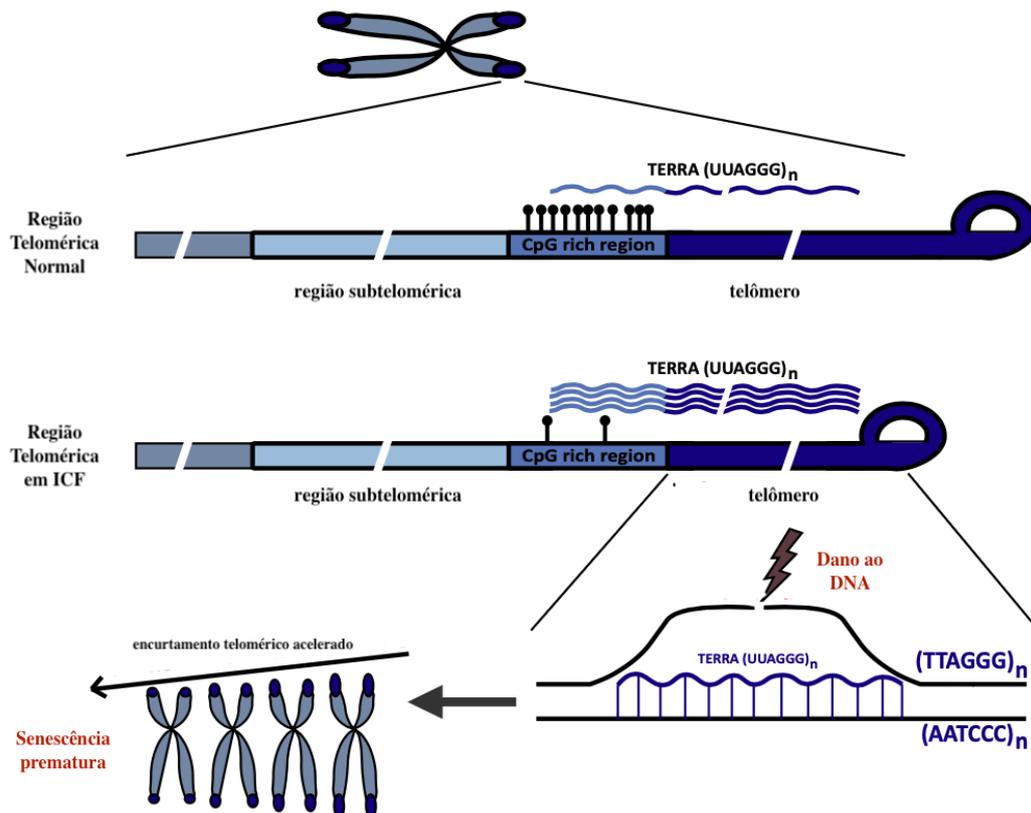


Figura 9. Encurtamento telomérico acelerado em pacientes com ICF tipo I (adaptado de TOUBIANA;SELIG, 2018).

Os níveis de TERRA também são regulados por TRF2. A depleção de TFR2 está associada ao aumento da transcrição de TERRA. Quando o TFR2 é removido, a cromatina telomérica se torna acessível à RNAPII. Por outro lado, O TFR2 é capaz de suprimir a transcrição de TERRA através do domínio de homodimerização (PORRO; FEUERHAHN; DELAFONTAINE; RIETHMAN *et al.*, 2014).

TERRA é capaz de formar híbridos de DNA:RNA, denominados R-loops, nas porções subteloméricas e teloméricas (BALK; MAICHER; DEES; KLERMUND *et al.*, 2013). Os R-loops devem ser mantidos em níveis adequados; tanto seu aumento quanto sua diminuição estão associados a lesão do DNA (GARCIA-MUSE; AGUILERA, 2019; WELLS; WHITE; STIRLING, 2019). Duas RNasesH controlam os níveis de R-loops. A RNaseH1 funciona independentemente do ciclo celular e é responsável por reduzir o estresse celular causado pelos R-loops. Já a RNaseH2 funciona durante as fases S, G2 e M do ciclo celular, sendo responsável por remover os R-loops durante a fase S, além de realizar reparo por excisão de ribonucleotídeos erroneamente incorporados ao DNA pela DNA polimerase (LOCKHART; PIRES; BENTO; KELLNER *et al.*, 2019).

1.6 Funções celulares do TERRA

TERRAs formam R-loops nas porções subteloméricas e teloméricas. Os R-loops podem paralisar a forquilha de replicação do DNA, promovendo lesão ao DNA e encurtamento telomérico (RIPPE; LUKE, 2015). Além disso, o TERRA pode se ligar à telomerase, inibindo a sua função *in vitro* (REDON; REICHENBACH; LINGNER, 2010; SCHOEFTNER, STEFAN; BLASCO, MARIA A., 2008). *In vivo*, estudos realizados em *Saccharomyces cerevisiae*, a depleção de Rat1p, uma 5'-3' exonuclease que degrada TERRA, está associada ao aumento dos níveis de TERRA e R-loops, diminuição da atividade da telomerase e encurtamento telomérico (LUKE; PANZA; REDON; IGLESIAS *et al.*, 2008). Em células embrionárias de camundongo, a quantidade de TERRA possui relação inversa com a função da telomerase (CHU; CIFUENTES-ROJAS; KESNER; AEBY *et al.*, 2017). Em fibroblastos de pacientes com ICF tipo I, existem altos níveis de TERRA, com formação de R-loops, lesão do DNA e encurtamento telomérico.

De forma contrária ao exposto acima, TERRA pode promover aumento do comprimento telomérico via telomerase. Em *Saccharomyces cerevisiae* e em *Schizosaccharomyces pombe*, o encurtamento telomérico induz a expressão de TERRA.

Durante a fase S, a telomerase forma *clusters* com TERRA, os quais são recrutados aos telômeros mais curtos, promovendo a função da telomerase em *cis* (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; MORAVEC; WISCHNEWSKI; BAH; HU *et al.*, 2016).

TERRA também pode promover aumento do comprimento telomérico por vias alternativas à telomerase (ALT). Em *Saccharomyces cerevisiae*, telômeros criticamente curtos acumulam TERRA e R-loops. O acúmulo de R-loops provoca dano no DNA durante a fase S, ativando as vias de reparo por homologia direta e promovendo o aumento do telômero. Em células que promovem alongamento telomérico por ALT, o acúmulo de R-loops de TERRA é um dos principais gatilhos para deflagrar as via de reparo por homologia direta (GRAF; BONETTI; LOCKHART; SERHAL *et al.*, 2017).

Os diferentes resultados encontrados podem ser justificados pela utilização de diferentes linhagens celulares (células embrionárias de camundongos, células dependentes da telomerase, células com atividade de ALT e leveduras). Além disso, a utilização de células primárias é rara e o papel do TERRA na manutenção dos telômeros nessa população não é descrita.

Além de controlar a expressão de TERRA, TFR2 interage com estruturas G quadruplex de TERRA através de seu domínio GAR, promovendo estabilidade dessas estruturas de TERRA e do DNA telomérico. A diminuição da interação TERRA-TFR2 e a depleção de TFR2 alteram a localização dos TERRAs e induzem grande quantidade de lesão do DNA telomérico (DENG; NORSEEN; WIEDMER; RIETHMAN *et al.*, 2009; MEI; DENG; VLADIMIROVA; GULVE *et al.*, 2021).

Os TERRAs interagem com ATRX e compartilham diferentes alvos gênicos, modulando suas expressões. TERRA e ATRX possuem funções antagônicas em regiões promotoras dos genes. Quando o TERRA interage com o ATRX em regiões promotoras, há aumento da expressão gênica; já a ausência desta interação e a atuação isolada do ATRX em regiões promotoras promove diminuição da expressão gênica. Dentre os genes regulados por esta interação encontram-se genes envolvidos na conformação da cromatina, transcrição, alteração da matriz nuclear, replicação do DNA, controle do ciclo celular, controle do telômero e formação dos corpos de Cajal (figura 10) (CHU; CIFUENTES-ROJAS; KESNER; AEBY *et al.*, 2017).

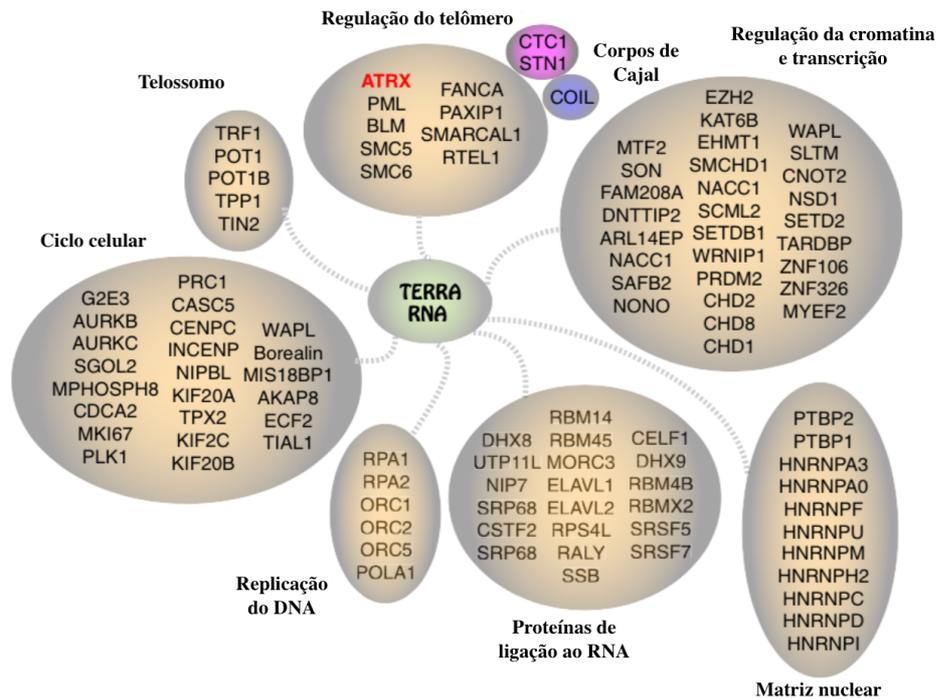


Figura 10. Genes regulados pela interação ATRX e TERRA (adaptado de CHU; CIFUENTES-ROJAS; KESNER; AEBY et al., 2017).

Conforme exposto acima, os TERRAs participam do controle das funções do telômero, atividade da telomerase, alongamento telomérico, modificação da estrutura da cromatina e regulação da expressão gênica (figura 11). Além disso, os dados sugerem que os R-loops devem ser mantidos em níveis ótimos. Baixa quantidade de R-loops está associada a repressão gênica, disfunção das vias de reparo de DNA e encurtamento telomérico; entretanto, alta quantidade de R-loops está associada a ativação gênica, instabilidade genômica e disfunção telomérica (GARCIA-MUSE; AGUILERA, 2019; KROUPA; TOMASOVA; KAVEC; SKROBANEK *et al.*, 2022; WELLS; WHITE; STIRLING, 2019).

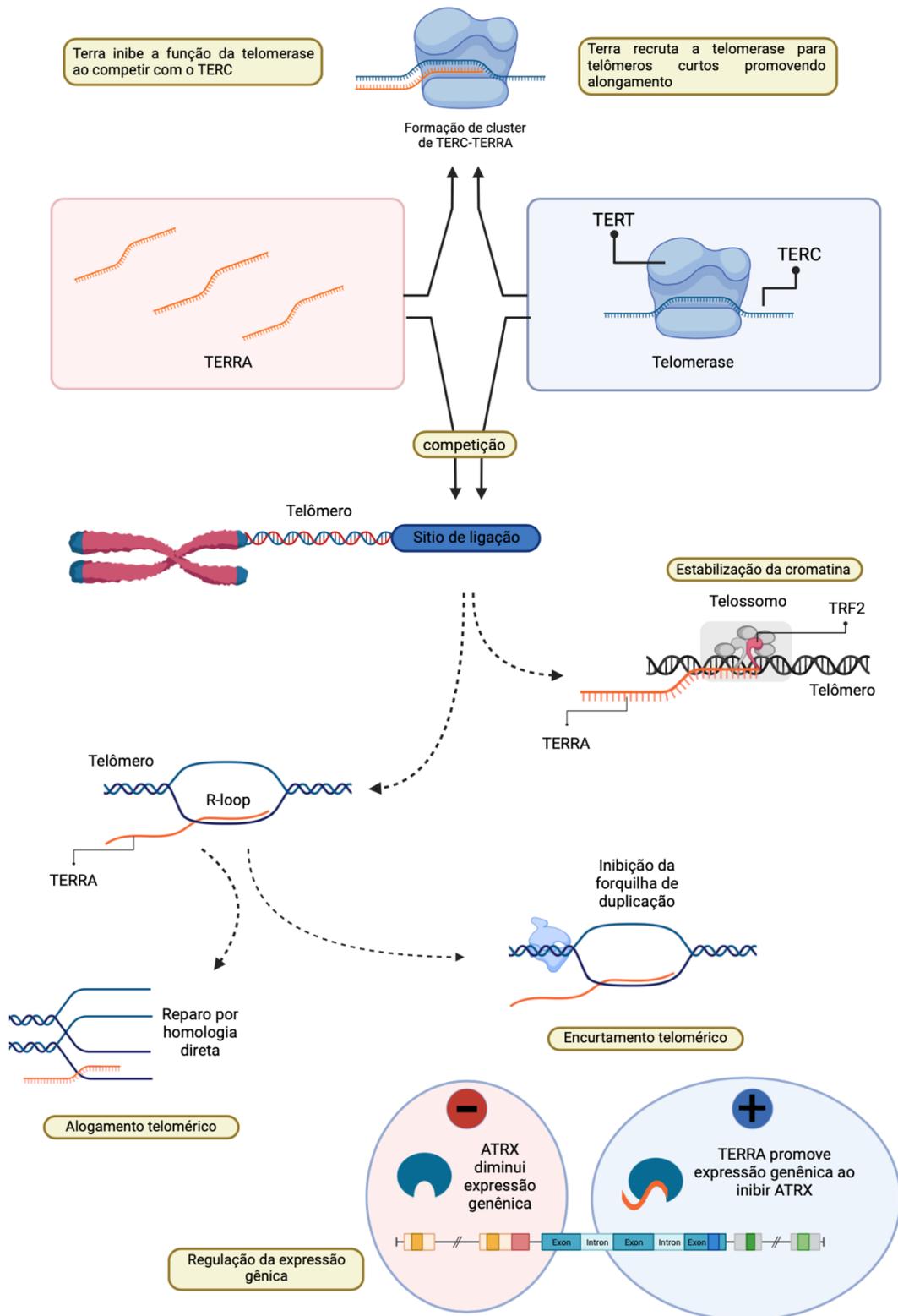


Figura 11. Funções do TERRA (adaptado de KROUPA; TOMASOVA; KAVEC; SKROBANEK et al., 2022, com modificações feitas com BioRender.com).

1.7 Expressão do TERRA nas doenças hematológicas

Estudos que analisam as funções do TERRA em células primárias são escassos e em doenças hematológicas, mais raros. Nosso grupo inicialmente realizou o *screening* em pacientes com doenças oncohematológicas. Zanelato estudou a expressão de TERRA, *TFR2*, *TERT*, a função da telomerase e a formação de R-loops em medula óssea e/ou sangue periférico de pacientes com diagnóstico de LMA (n = 17), leucemia linfoblástica aguda (LLA) (n = 5), telomeropatias (n = 9) e de doadores saudáveis (n = 18) (ZANELATTO, Leonardo Campos).

A expressão de TERRAs (10q, 15q, 20q e XqYq) foi significativamente maior em pacientes com LMA quando comparados aos doadores saudáveis ($p < 0,05$). Pacientes com LMA e com telomeropatia apresentaram comprimento telomérico muito curto em comparação aos controles ($p < 0,05$). Este dado indica que o encurtamento telomérico não é responsável pelo aumento da transcrição de TERRA em células hematopoéticas (figura 12) (ZANELATTO, Leonardo Campos).

Esse estudo sugere que o aumento da expressão de TERRA é presente nos pacientes com LMA, o qual não está relacionado ao fenótipo leucêmico/neoplásico, visto que pacientes com LLA apresentaram baixa expressão de TERRA. Além disso, a distribuição bimodal da expressão de TERRA e *TERT*, assim como da atividade da telomerase indicam possível relação entre esses fatores. Contudo, devido à baixa amostragem, o estudo não permitiu determinar este tipo de correlação. Por fim, este estudo demonstrou que há acúmulo de R-loops em pacientes com LMA quando comparados a controle saudáveis (figura 12) (ZANELATTO, Leonardo Campos).

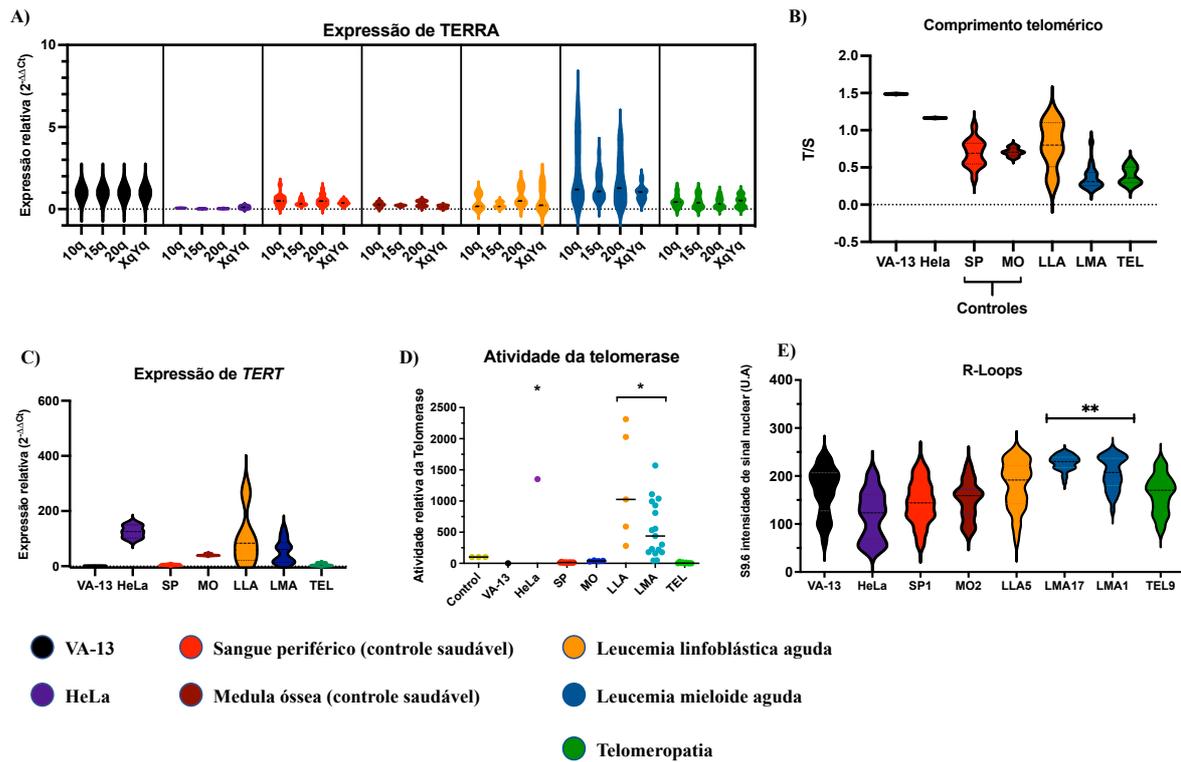


Figura 12. A) Expressão relativa de TERRA em 10q, 15q, 20q, XqYq; controle positivo: VA13. B) Comprimento telomérico determinado por qPCR. C) Expressão relativa de *TERT*; controle positivo: HeLa. D) Atividade da telomerase mensurada através de TRAP; controle positivo: HeLa. E) Detecção de R-loops pela intensidade de sinal nuclear utilizando imunofluorescência.

2. Justificativa

2. Justificativa

TERRA possui diversas funções na biologia dos telômeros: atua no controle da função da telomerase, na estrutura e compactação do telômero, e no alongamento telomérico por via dependente e independente da telomerase. Além disso, atua no controle de expressão gênica de diversas proteínas.

As alterações da expressão de TERRA já foram descritas em células de pacientes com ICF tipo I e em algumas linhagens celulares. Estudos utilizando células primárias são extremamente raros e, conforme demonstrado em trabalho prévio do nosso grupo, os níveis de TERRA estão desregulados em pacientes com LMA. Contudo, devido ao baixo número de pacientes com LMA incluídos no trabalho prévio, a importância do TERRA nas LMAs não pode ser substancialmente entendida. Dessa forma, é necessário expandir o estudo dos níveis de TERRA e sua importância na dinâmica telomérica em pacientes com LMA.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi determinar a contribuição de TERRA para a manutenção dos clones leucêmicos e sua participação na leucemogênese.

3.1 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos foram caracterizados em células de medula óssea de pacientes e/ou linhagens de LMA:

- 1) Mensuração do comprimento telomérico;
- 2) Quantificação da expressão de *TERT*, *TFR2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*;
- 3) Quantificação da expressão de TERRA 10q, 15q, 20q, XqYq, 17p e XpYp;
- 4) Caracterização do perfil citogenético e molecular em LMAs e sua relação com as proteínas de dinâmica telomérica;
- 5) Indução de superexpressão de RNaseH1 em linhagens celulares de LMA para avaliação da dinâmica dos R-loops.

4. Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Cultura de bactérias, plasmídeos e enzimas de restrição

4.1.1.a Bactérias

- *One Shot Top stb13 chemically competente E. coli* (Cat# C737303, Invitrogen);

4.1.1.b Plasmídeos

- pEGFP-RNASEH1 (Cat# 108699, Addgene)
- pEGFP-N1-FLAG (Cat# 60360, Addgene)
- psPAX2 (Cat# 12260, Addgene)
- pMD2G (Cat# 12259, Addgene)
- pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro cDNA cloning and expression vector (Cat# CD510-B1, SBI System Biosciences)

4.1.1.b Enzimas de restrição e de ligação

- NotI (Cat# R0189S, New England Biolabs)
- NheI (Cat# R0131M, New England Biolabs)
- T4 DNA ligase (Cat# M0202, New England Biolabs)

4.1.2 Cultura de células

4.1.2.a Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Terapia Celular (CTC-USP).

- VA13: linhagem celular derivada de fibroblastos de pulmão e deficiente sem telomerase;
- HeLa: linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical;
- Lenti X 293T: subclone da linhagem celular derivada de rim embrionário;
- Jurkat: linhagem celular derivada de linfoblastos T;
- THP1: linhagem celular derivada de uma leucemia monocítica aguda;
- NB4: linhagem celular derivada de uma leucemia promielocítica aguda;

- H1: linhagem celular embrionária;

4.1.2.c Meios de cultura e outros reagentes

- DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified eagle medium*), (Cat# 11885-084, Gibco);
- DMEM *high glucose*, (Cat# 11594-486, Gibco);
- RPMI 1640 (Cat# 31800-0220, Gibco);
- Soro bovino fetal (SBF) (Cat# 16000044; Gibco), usado inativado a 56°C por 30 min e filtrado;
- Meio LB Broth (Cat# L3022-1KG, Sigma-Aldrich);
- Água Milli-Q;
- Lipofectamina 3000 (Cat# L3000150, Invitrogen);
- Filtro de membrana, 0,45 µm (Cat# 635492, Millipore);
- *Polybrene* (Cat# sc134220A; Santa Cruz Biotechnology).

4.1.2.d Meios de cultura utilizados (formulação)

	Reagente	Concentração final
RPMI 1640 a 10% SBF	RPMI 1640	n/a
	SBF	10%

	Reagente	Concentração final
RPMI 1640 a 20% SBF	RPMI 1640	n/a
	SBF	10%

	Reagente	Concentração final
DMEM a 10% SBF	RPMI 1640	n/a
	SBF	10%

	Reagente	Concentração final
DMEM <i>high glucose</i> a 10% SBF	RPMI 1640	n/a
	SBF	10%

4.1.3 Eletroforese

- Agarose (Cat# 15517-014, Gibco)
- 1 kb DNA ladder (Cat# D0428-1VL, Invitrogen)
- 100 bp DNA ladder (Cat# 15628019, Invitrogen)
- Brometo de etídio (Cat# 15585-011, Invitrogen)
- Azul de bromofenol (Cat# B5525, Sigma-Aldrich)

4.1.4 Extração de DNA e RNA

- *Genra Puregene Blood* (Cat# 158445; QIAGEN);
- *Ficoll Histopaque 1077* Cat# 10771-500; Sigma-Aldrich;
- *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep kit* (Cat# K210007; Invitrogen);
- *Agarose Gel DNA extraction kit* (Cat# 11696505101; Roche);
- *Trizol LS* (Cat# 10296028; Invitrogen);
- Clorofórmio (Cat# C1062.01.BJ; Synth);
- Isopropanol (Cat# A1078.01.BJ; Synth);
- Etanol (Cat# A1084.01.BJ; Synth), utilizado a 70%.
- Espectrofotômetro *DS-11* (DeNovix)

4.1.5 Imunofluorescência

4.1.1.a Anticorpos primários

- Anticorpo anti híbridos de DNA:RNA (S9.6), coelho IgG, 100 µg (Cat# Kf-Ab01137-23.0, Kerfast);
- Anticorpo anti gama H2AX, coelho IgG, 1mg/mL (Cat# ab2893, Abcam).

4.1.1.b Anticorpos secundários

- Anticorpo AF594 anti coelho, cabra fragmento F(ab')₂, 2 mg/mL (Cat# A11072, ThermoFisher).

4.1.1.c Reagentes e materiais para imunofluorescência

- Solução DAPI, 1 mg/mL (Cat# 62248, ThermoFisher);
- Fluoromount-G (Cat# 17984-25, Electron Microscopy Sciences);
- Paraformaldeído (Cat# 158127, Sigma-Aldrich);
- Metanol (Cat# A1085.BJ, Synth);
- Solução de albumina bovina (7,5%) (Cat# 158260-037, Sigma-Aldrich);
- Tween 20 (Cat# 1280, Gold Lab);
- Triton X 100 (Cat# 11869, Merck);
- PBS 10x (Cat# 70013-032, Gibco);
- Água livre de nucleases (Cat# W4502, Sigma-Aldrich);
- Lâmina para microscópio (*Shandon Cytoslide, microscope slides for shandon cytospin, coated*) (Cat# 5991056, Sigma-Aldrich);
- Lamínulas para microscópio 13 mm (Knittel glass);
- *DakoCytomation Pen* (Cat# S2002, Dako);
- *BD Cytotfix/Cytoperm kit* (Cat# 554722, BD Biosciences).

4.1.6 Materiais de laboratório

- Lista de material de laboratório utilizados no presente estudo:
 - Pipetas sorológicas 2, 5, 10, 25 e 50 mL com filtro (Kasvi);
 - Ponteira 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L com filtro (Kasvi);
 - Tubos de micro centrifugação 200 μ L, 1500 μ L e 2000 μ L (Kasvi);
 - Tubos de centrifugação cônicos (tipo Falcon) 15 e 50 mL (Kasvi);
 - Frascos para cultura celular 50 mL, 25 cm² (Cat# 690175, Greiner Bio-One);
 - Frascos para cultura celular 250 mL, 75 cm² (Cat# 658175, Greiner Bio-One);
 - Placa para cultura celular 24 poços (Cat# 662160, Greiner Bio-One);
 - Sistema de filtragem à vácuo (Cat# S2GPU05RE, Millipore);
 - Balão volumétrico 500 mL e 1 L; Proveta 500 mL e 1 L;
 - Frasco Erlenmeyer 50, 100 mL, 500 mL e 1 L.

4.1.7 Primers e sondas

- Lista de *primers* utilizados na RT-qPCR para análise dos TERRAs.

Primer	Direção	Sequência (5'-3')	Fabricante
hTERRA RT	-	CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA	IDT
Hβ-actina RT	-	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	IDT
10q TERRA	<i>forward</i>	TCA AGG TCA GAG ACC AGT TAG AAC G	IDT
10q TERRA	<i>reverse</i>	TGC TGC ATT TGA GTT CCG ACG	IDT
15q TERRA	<i>forward</i>	CAG CGA GAT TCT CCC AAG CTA AG	IDT
15q TERRA	<i>reverse</i>	AAC CCT AAC CAC ATG AGC AAC G	IDT
17p TERRA	<i>forward</i>	CTT ATC CAC TTG TGT CCC AAG G	Invitrogen
17p TERRA	<i>reverse</i>	CCC AAA GTA CAC AAA GCA ATC C	Invitrogen
20q TERRA	<i>forward</i>	TGG ATA CAT GGG CGA TAC TCA GG	IDT
20q TERRA	<i>reverse</i>	GGA CGC ATG GAC TTC AGT CTG	IDT
XpYp TERRA	<i>forward</i>	AAG AAC GAA GCT TCC ACA GTA T	Invitrogen
XpYp TERRA	<i>reverse</i>	GGT GGG AGC AGA TTA GAG AAT AAA	Invitrogen
hβ-actina	<i>forward</i>	TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA	IDT
hβ-actina	<i>reverse</i>	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	IDT

- Lista de sondas utilizadas para análise da expressão dos genes *TERT*, *TFR2*, *RNaseH1*, *RNaseH2* e *ATRX* por qPCR.

Gene	Sondas	Fabricante
<i>TERT</i>	Hs99999022_m1	IDT
<i>TRF2</i>	Hs.PT.58.2675654	IDT
<i>ATRX</i>	Hs00997529_m1	IDT
<i>RNaseH1</i>	Hs.PT.58.25730093	IDT
<i>RNaseH2</i>	Hs.PT.58.40252369	IDT
<i>GAPDH</i>	Hs.02786624_g1	IDT

- Lista de *primers* utilizados durante a qPCR para mensuração do comprimento telomérico

Primer	Direção	Sequência (5'-3')	Fabricante
Tel	<i>forward</i>	CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT	Invitrogen
Tel	<i>reverse</i>	GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT	Invitrogen
36B4	<i>forward</i>	CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC	Invitrogen
36B4	<i>reverse</i>	CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A	Invitrogen

- Lista de *primers* utilizados no sequenciamento do plasmídeo construído.

Primer	Direção	Sequência (5`-3`)	Fabricante
1	<i>forward</i>	AAT GGG CGG TAG GCGTGT A	Invitrogen
	<i>reverse</i>	CAT GTG CTT TGC ATA CGG CT	Invitrogen
2	<i>forward</i>	GGA CAA GAA TCG GAG GCG AA	Invitrogen
	<i>reverse</i>	CAG GCT GCA TGA ATT TCC GC	Invitrogen
3	<i>forward</i>	GTA ATG GGC GTA GAA GGC CG	Invitrogen
	<i>reverse</i>	GAC CAG GAA CAT GCA TCC ACT	Invitrogen
4	<i>forward</i>	TGC AAA GCC ATT GAA CAA GCA	Invitrogen
	<i>reverse</i>	GGT ACC GTC GAC TGC AGA AT	Invitrogen
5	<i>forward</i>	TGT TCC TGG TCA TTC GGG ATT	Invitrogen
	<i>reverse</i>	GGG TCT TGT AGT TGC CGT CG	Invitrogen
6	<i>forward</i>	GTC AAC CGC ATC GAG CTG AA	Invitrogen
	<i>reverse</i>	GAC CAT GTG ATC GCG CTT CT	Invitrogen
7	<i>forward</i>	TGA GCA AAG ACC CCA ACG AG	Invitrogen
	<i>reverse</i>	GGA CAA ACC ACA ACT AGA TGC AG	Invitrogen

4.1.8 Reagentes para PCR

- *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Cat# 4304437; Applied BioSystems);
- *PowerSYBR Green PCR Master Mix* (Cat# 43676659; Applied BioSystems);
- *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Cat# 4368814; Applied BioSystems);
- *RNase Inhibitor, human 40.000 U/mL* (Cat# R26020-2.kU; Sigma-Aldrich);
- *Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit* (Cat# 204074; QIAGEN).

4.1.9 Sequenciamento por Sanger

- *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Cat# 4337455; Applied BioSystems);
- *USB ExoSapIT PCR product Cleanup Reagent* (Cat# 78200; Affymetrix).

4.1.10 Sequenciamento de nova geração

- *QIAseq Targeted DNA Panels* (Cat# 333502; QIAGEN).
- *NanoDrop™ 2000* (Cat# ND-2000; ThermoFisher)
- *Qubit 4.0 fluorometer* (Cat# Q33238; ThermoFisher)
- *Fragment Analyzer* (Cat# DFN-474-0500; Agilent)

4.1.11 Tratamento de RNA com DNase

- *RNase-Free DNase Set* (Cat# 79254; QIAGEN);
- *RNA Clean and Concentrator-25* (Cat# R1018; Zymo Research).

4.1.12 Viabilidade celular com MTT

- *MTT formazan* (Cat# 57360-69-7; Sigma-Aldrich).

4.2 Métodos

4.2.1 Transformação e expansão de bactérias a partir de plasmídeos

As bactérias *One Shot Top stb13 chemically competent E. coli* foram transformadas com cada plasmídeo conforme protocolo do fabricante. As bactérias foram descongeladas no gelo para cada transformação; 100 ng de DNA de cada plasmídeo foram adicionados e misturados gentilmente; os frascos foram incubados no gelo por 30 min; após, foram colocados em banho maria a 42°C por 45 s; os frascos foram incubados novamente no gelo por 2 min; 250 µL do meio SOC foram adicionados a cada frasco; os fracos foram então incubados a 37°C por 1 h a 225 rpm. Após, 100 µL de cada reação de transformação foram aplicados em placas de 10 cm, contendo meio LB com ágar e 100 µg/mL de ampicilina para seleção.

Uma colônia individual por plasmídeo foi selecionada, transferida para um tubo Falcon contendo 10 mL de meio LB e 100 µg/mL de ampicilina, sendo incubadas a 37°C

por 8 h a 250 rpm. Foi retirado 1 mL do meio de cada cultura inicial e transferido para frascos de Erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB e 100 µg/mL de ampicilina, sendo incubados a 37°C por 16 h a 250 rpm. No dia seguinte, o meio de cultura foi centrifugado a 6.000 x g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o restante do material foi selecionado para extração de DNA plasmidial.

4.2.3 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada conforme protocolo do kit *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep*. Inicialmente, as colunas foram equilibradas aplicando 30 mL do *equilibration buffer* (EQ1). Foram adicionados 10 mL do *resuspension buffer* (R3) com RNase A a cada *pellet* de células. Foram adicionados 10 mL do *lysis buffer* (L7), misturados e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Após, foram adicionados 10 mL do *precipitation buffer* (N3). Os lisados dos precipitados foram aplicados às colunas. As colunas foram lavadas com 50 mL do *wash buffer* (W8). Os DNAs das colunas foram eluídos adicionando 15 mL do *elution buffer* (E4) em tubos de eluição. Foram adicionados 10,5 mL de isopropanol a cada tubo de eluição. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 5 mL de etanol 70% aos pellets de DNA. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, por 30 min a 4 °C. Os tubos foram secados em ar ambiente e os *pellets* de DNA foram diluídos em 200 µL de *buffer* TE.

4.2.3 Construção do vetor lentiviral

As sequências RNaseH1-GFP e GFP dos plasmídeos pEGFP-RNASEH1 e pEGFP-N1-FLAG foram transferidas para o vetor lentiviral *pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro cDNA cloning and expression vector*. Os dois insertos foram cortados com as enzimas de restrição NotI e NheI. Para isto, 500 ng de cada DNA plasmidial foi incubado com *NEBuffer*, 5 unidades de cada enzima de restrição e completados com água ultrapura até 50 µL e incubados por 1 h a 37 °C.

Após digestão com enzimas de restrição, as amostras foram corridas em gel de agarose e os fragmentos de DNA de interesse foram selecionados (figura 13). A purificação de DNA foi realizada conforme protocolo do *Agarose Gel DNA extraction kit*. Foi adicionado uma proporção de 300 µL do *Agarose Solubilization Buffer* para cada 100 mg de gel de agarose. Foi adicionado 10 µL do *Silica Suspension* à mistura inicial, sendo incubado a 58°C por 10 min

com vórtex a cada 2 min. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 30 s e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* contendo o DNA foi ressuspensão em 500 μ L do *Nucleic Acid Binding Buffer*, centrifugado a 12.000 x g por 30 s e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 500 μ L do *Washing Buffer*, centrifugado a 12.000 x g por 30 s e o sobrenadante foi descartado; essa etapa foi repetida uma vez. O excedente de sobrenadante foi retirado com pipetagem, os tubos foram secados em ar ambiente e os *pellets* de DNA foram diluídos em 30 μ L de *buffer* TE.

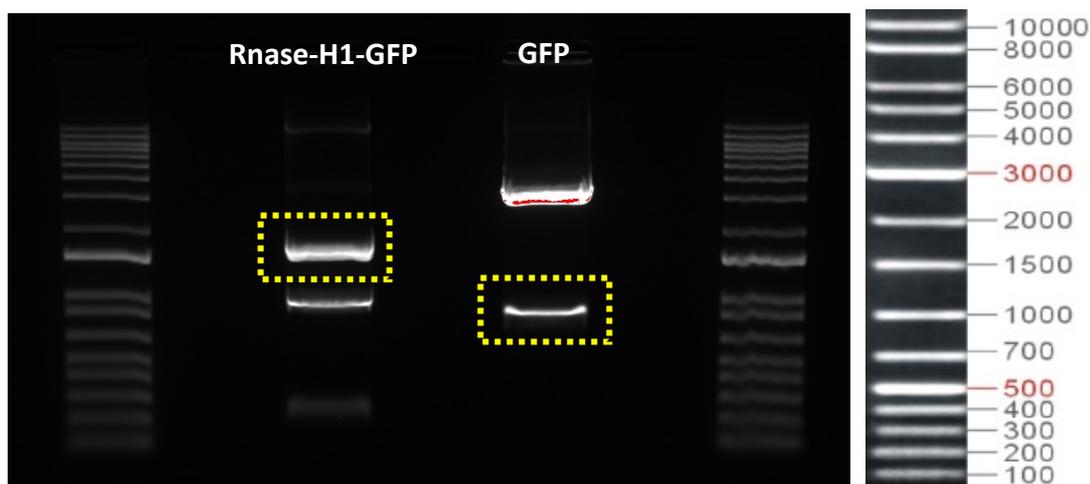


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose demonstrando as sequências da RNaseH1-GFP (1577 pb) e do GFP (854 pb). Os fragmentos destacados foram selecionados para purificação de DNA e construção do vetor lentiviral.

Os fragmentos de DNA plasmidial purificados na etapa anterior foram inseridos no plasmídeo lentiviral utilizando a *T4 DNA ligase* conforme protocolo do fabricante. Os novos plasmídeos foram expandidos em bactérias, o DNA plasmidial foi separado e submetido a tratamento com enzima de restrição e corridos em gel de agarose conforme descrito acima e nas seções 4.2.1 e 4.2.2 (figura 14). As sequências de DNA foram confirmadas por sequenciamento por Sanger.

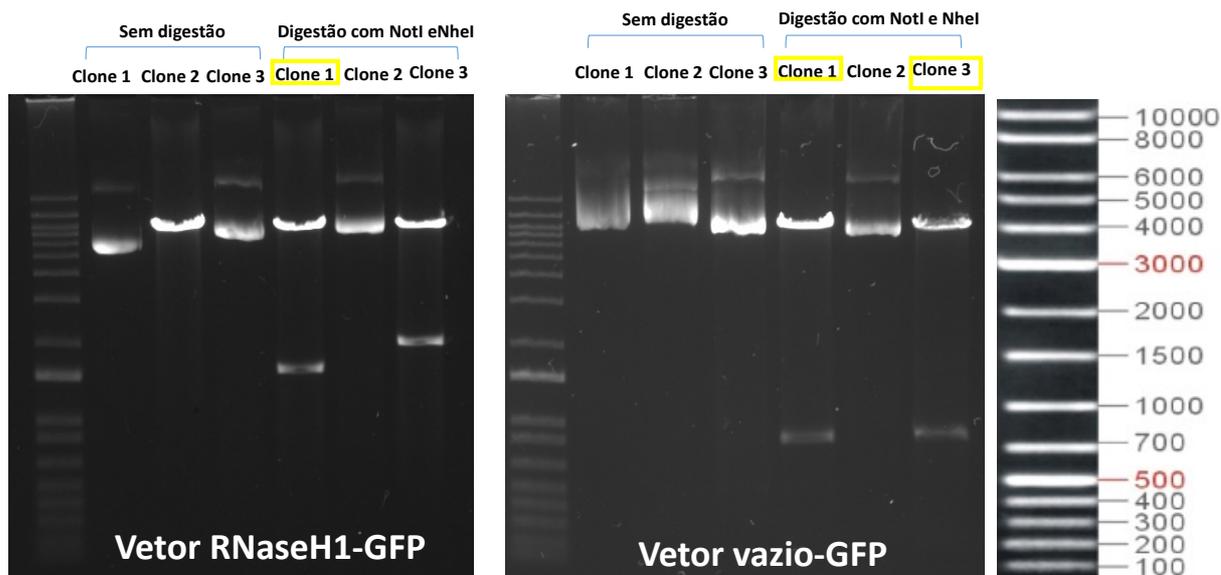


Figura 14. Gel de agarose dos plasmídeos lentivirais clonados após inserção das sequências RNaseH1-GFP e GFP. Os clones 1 do vetor RNaseH1-GFP e os clones 1 e 3 do vetor vazio-GFP foram escolhidos para a produção do vetor lentiviral.

4.2.4 Produção lentiviral e transdução das linhagens NB4 e THP1

Para a produção de vetor lentiviral, 2×10^7 células da linhagem *Lenti X 293T* foram semeadas em frascos de 250 mL e suplementadas com *DMEM high glucose* a 10%. Foram adicionados 60 μ g dos quatro DNAs plasmidiais, plasmídeos de transferência RNaseH1-GFP ou vazio-GFP, psPAX2 e pMD2.G na proporção 3:2:1, respectivamente, usando Lipofectamina 3000 conforme protocolo do fabricante. Os sobrenadantes contendo as partículas virais foram coletados após 24 h e 48 h e filtrados através da membrana de 0,45 μ m. O sobrenadante filtrado foi concentrado por centrifugação a 25.000 x g, por 2 h a 4°C com solução de sucrose a 20%. O concentrado viral foi ressuspenso em PBS, aliqotado e armazenado a -80°C. Os títulos virais foram determinados por citometria de fluxo após a transdução da linhagem Jurkat. As linhagens celulares NB4 e THP1 foram transduzidas com lentivírus (multiplicidade de infecção de 5) na presença de *polybrene* a 8 mg/mL. As placas foram centrifugadas a 1.000 x g, por 90 min a 32°C e incubadas por 48 h. Após 48 h, as células transduzidas foram analisadas por citometria de fluxo para analisar a frequência de células GFP positivas e; posteriormente, selecionadas a partir da expressão de GFP (figura 15).

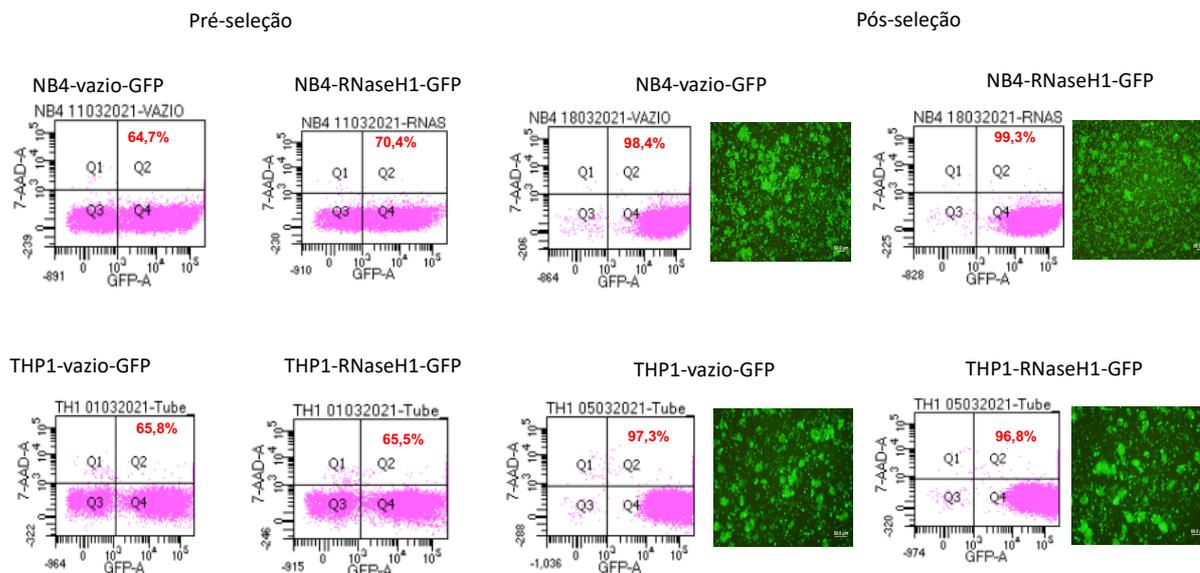


Figura 15. Gráficos de citometria demonstrando a positividade do GFP em células transduzidas com vetores vazio-GFP e RNaseH1-GFP pré-seleção por citometria de fluxo e gráficos de citometria e imagens de microscopia demonstrando a positividade do GFP em células transduzidas com vetores vazio-GFP e RNaseH1-GFP pós-seleção por citometria de fluxo.

4.2.5 Extração, quantificação e integridade do RNA

A extração de RNA tanto das células leucêmicas de pacientes como das linhagens celulares foi realizada com *TRIzol LS*, conforme protocolo do fabricante, com pequenas modificações. *Pellets* de células contendo 5×10^6 células foram dissolvidos em 250 mL de PBS e 750 mL de *TRIzol LS*, sendo incubados por 5 min a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio, homogeneizado, incubado por 10 min a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 x g, por 15 min a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi retirada e transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500 μ L de isopropanol, incubado por 10 min a 4°C, centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4°C, sendo descartado o sobrenadante. Ao *pellet* de RNA, foi adicionado 1.000 μ L de etanol 70%, centrifugado a 12.000 x g, por 15 min a 4°C, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* de RNA foi secado a temperatura ambiente e ressuscitado em 30 μ L de água ultrapura.

Após a extração, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro *DS-11* (DeNovix) e as razões 260/280 e 260/230 foram estabelecidas. Para verificar a integridade, 1 μ g de RNA foi aplicado em gel de 0,8% agarose e corrido a 80 V por 1 h e 30 min.

4.2.6 Tratamento dos RNAs com DNase I e purificação pós-tratamento

Os RNAs foram submetidos a dois ciclos de tratamento com DNase I e purificação. O tratamento com DNase I foi realizado com *RNase-free DNase Set* conforme protocolo do estudo. A proporção dos reagentes está descrita na tabela 4 (abaixo). Os reagentes foram misturados e incubados por 55 min a temperatura ambiente.

Tabela 4. Lista de reagentes utilizados durante o tratamento com DNase I.

Reagente	Quantidade
RNA	15 µg
Buffer RDD	10 µL
DNase I	2,6 µL (2,7 U/µL)
Água ultrapura	Adicionada para completar 50 µL de volume final

A etapa de purificação de RNA pós-tratamento com DNase I foi realizada com o *RNA Clean and Concentrator-25* conforme protocolo do fabricante. O RNA foi misturado com 2 volumes do *RNA Binding Buffer* e 1 volume de etanol absoluto. Este *mix* foi transferido a uma coluna com tubo coletor. A coluna foi tratada com 400 µL de *RNA Prep Buffer*, 700 µL de *RNA Wash Buffer* e 400 µL de *RNA Wash Buffer*, sendo centrifugada e o sobrenadante descartado após a adição de cada reagente. Por fim, o RNA foi eluído em água ultrapura em microtubos.

4.2.7 RT-PCR para TERRA

O cDNA para análise da expressão de TERRA foi sintetizado a partir 2 µg de RNA submetido a dois ciclos de tratamento com DNase I. Para a RT-PCR, foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* na presença do *RNase Inhibitor* sendo realizado conforme protocolo do fabricante. O volume final de cada reação foi de 20 µL. A proporção dos reagentes utilizados está descrita na tabela 5. O programa do termociclador está descrito na tabela 6.

Tabela 5. Lista de reagentes no RT-PCR para TERRA.

Reagente	Volume (1x)
Água ultrapura	3,5 μ L
10x RT buffer	2 μ L
25x dNTP	1 μ L
10 μ M oligo primer TERRA	1 μ L
1 μ M primer β -actina	1 μ L
RNase <i>inhibitor</i>	0,25 μ L
MultiScribe RT (50U/ μ L)	1,25 μ L

Tabela 6. Programa no termociclador para RT-PCR TERRA.

Temperatura	Tempo
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	∞

4.2.8 qPCR para expressão de TERRA

O cDNA sintetizado na etapa anterior foi diluído na proporção 1:2 com água ultrapura. As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas com o *Power SYBR Green PCR Master Mix* seguindo o protocolo do fabricante. Quando a variação do C_T entre as duplicatas foi $\geq 0,5$ o experimento foi refeito. A proporção dos reagentes utilizados está descrita na tabela 7. O programa do termociclador está descrito na tabela 8.

Tabela 7. Lista de reagentes do qPCR para TERRA

Reagente	Volume (1x)
Água ultrapura	6 µL
2x <i>Power SYBR Green</i>	10 µL
25x dNTP	1 µL
10 µM TERRA <i>forward</i> (10q, 15q, 20q, XqYq, 17p ou XpYp)	1 µL
10 µM TERRA <i>reverse</i> (10q, 15q, 20q, XqYq, 17p ou XpYp)	1 µL
cDNA diluído	2 µL

Tabela 8. Programa no termociclador para qPCR TERRA.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	10 min	1x
95°C	15 seg	40x
60°C	1 min	
95°C	15 seg	Etapa da curva de melting
60°C	1 min	
95°C	15 seg	
60°C	15 seg	

A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizada pela expressão do gene de referência (β -actina), utilizando a expressão da VA13 como controle.

$$\Delta C_{T \text{ amostra}} = C_{T(\text{subtel}) \text{ amostra}} - C_{T(\beta\text{-actina}) \text{ amostra}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ amostra}} = \Delta C_{T \text{ amostra}} - \Delta C_{T \text{ VA13}}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_{T \text{ amostra}}} = \text{expressão relativa à VA13}$$

Os resultados calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foram normalizados para cada expressão de TERRA (10q, 15q, 20q, XqYq, 17p e XpYp), sendo atribuído em cada grupo o valor zero para a menor expressão e o valor 1 para a maior expressão.

4.2.9 RT-PCR para expressão dos genes *TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*

O cDNA para análise da expressão dos genes *TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2* foi sintetizado a partir de 1 µg RNA. A RT-PCR foi realizada utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* conforme protocolo do fabricante. A proporção dos reagentes utilizados está especificada na tabela 9, sendo o volume final de cada reação igual a 20 µL. O programa do termociclador está especificado na tabela 10.

Tabela 9. Lista de reagentes do RT-PCR para *TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*.

Reagente	Volume (1x)
Água ultrapura	3,5 µL
10x RT buffer	2 µL
25x dNTP	1 µL
10x Random Primer	2 µL
MultiScribe RT (50U/µL)	1,25 µL

Tabela 10. Programa no termociclador da RT-PCR (*TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*).

Temperatura	Tempo
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	∞

4.2.10 qPCR para expressão de *TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*.

O cDNA sintetizado na etapa anterior foi diluído na proporção 1:4 com água ultra pura. As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas com o *Taqman Universal Master Mix* seguindo o protocolo do fabricante. Experimentos com variações de C_T superiores a 0,5 entre as duplicatas foram repetidos. A proporção dos reagentes utilizados está caracterizada na tabela 11. O programa do termociclador está caracterizado na tabela 12.

Tabela 11. Lista de reagentes do qPCR para *TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*

Reagente	Volume (1x)
Água ultrapura	2 μ L
20x TaqMan Probe (<i>TERT</i> , <i>TRF2</i> , <i>ATRX</i> , <i>RNaseH1</i> , <i>RNaseH2</i> , <i>GAPDH</i>)	0,5 μ L
2x TaqMan Gene	5 μ L
cDNA diluído	2,5 μ L

Tabela 12. Programa no termociclador da qPCR (*TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1* e *RNaseH2*).

Temperatura	Tempo	Ciclos
50°C	2 min	1x
95°C	10 min	1x
95°C	15 seg	40x
60°C	1 min	

A expressão relativa em cada amostra foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizada pela expressão do gene de referência (*GAPDH*), utilizando a expressão da VA13 como controle para expressão dos genes *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1*, *RNaseH2* e a expressão da H1 como controle para expressão do gene *TERT*.

$$\Delta C_{T \text{ amostra}} = C_{T(\textit{gene}) \text{ amostra}} - C_{T(\textit{GAPDH}) \text{ amostra}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ amostra}} = \Delta C_{T \text{ amostra}} - \Delta C_{T \text{ VA13/H1}}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT \text{ amostra}} = \text{expressão relativa à VA13 ou H1}$$

Os resultados calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foram normalizados para cada expressão gênica (*TERT*, *TRF2*, *ATRX*, *RNaseH1*, *RNaseH2*), sendo atribuído em cada grupo o valor zero para a menor expressão e o valor 1 para a maior expressão.

4.2.11 Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA tanto das células leucêmicas de pacientes como das linhagens celulares foi realizada com *Genra Puregene Blood*, conforme protocolo do fabricante com pequenas modificações. As amostras de sangue periférico e medula óssea foram centrifugadas a 300 x g por 30 min em temperatura ambiente com *Ficoll Histopaque*, para separação da camada leucocitária. A camada leucocitária foi coletada, na qual foi adicionada 45 mL da *RBC Lysis Solution*, sendo incubada no gelo por 10 min, centrifugada a 300 x g por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células, dissolvido

em 1x PBS. As células foram contadas e separadas em alíquotas de 5×10^6 células/frasco. Foi adicionado 400 μL da *Cell Lysis Solution* ao *pellet* de células e incubado a 37°C até homogeneização. Foi acrescentado 150 μL da *Protein Precipitation Solution*, homogeneizado e centrifugado a 2.000 x g por 5 min. Em um novo tubo, foram adicionados 500 μL de isopropanol a 4°C e o sobrenadante do passo anterior, sendo a amostra homogeneizada e centrifugada a 2.000 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado 500 μL de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 2.000 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de DNA foi secado a temperatura ambiente, sendo posteriormente adicionado 50-100 μL da *Hydratation Solution* de acordo com o tamanho do *pellet*.

Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro DS-11 (DeNovix) e as razões 260/280 e 260/230 foram estabelecidas. Duas alíquotas de DNA a 50 ng/ μL foram separadas para o sequenciamento e para determinação do comprimento telomérico. Para verificar a integridade, 50 ng de DNA de cada amostra foram aplicados em gel de 1,5% agarose e corridos a 80V por 30 min.

4.2.12 qPCR para determinação do comprimento telomérico

O DNA extraído na etapa anterior foi utilizado para quantificação do comprimento telomérico conforme descrito previamente (GUTIERREZ-RODRIGUES; SANTANA-LEMO; SCHEUCHER; ALVES-PAIVA *et al.*, 2014). A determinação do comprimento telomérico por PCR consiste em duas reações: a primeira, denominada T, usa *primers* para amplificar a região telomérica, e a segunda, denominada S, usa *primers* para amplificar o gene *36B4*. Uma curva padrão foi utilizada em cada experimento usando um DNA de controle com diferentes concentrações seriadas (10, 5, 2,5, 1,125 e 0,625 ng). O experimento foi repetido caso o coeficiente de relação para a curva T e/ou curva S fosse $\leq 0,9$. A proporção dos reagentes utilizados está descrita na tabela 13. O programa do termociclador está descrito na tabela 14.

Tabela 13. Lista de reagentes do qPCR para comprimento telomérico.

Reagente	Volume (1x)
DNA (0,2 ng/ μ L)	8 μ L
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	10 μ L
Para T	
900 nM primer <i>Tforward</i>	1 μ L
900 nM primer <i>Treverse</i>	1 μ L
Para S	
900 nM primer <i>Sforward</i>	1 μ L
900 nM primer <i>Sreverse</i>	1 μ L

Tabela 14. Programa no termociclador para qPCR comprimento telomérico.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1x
98°C	7 seg	PCR T (25x) PCR S (35x)
60°C	10 seg	
4°C	∞	1x

Todos experimentos foram realizados em triplicatas. O comprimento telomérico foi representado pela razão T/S, que é calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

$$\Delta C_{T \text{ amostra}} = C_{T(T) \text{ amostra}} - C_{T(S) \text{ amostra}}$$

$$\Delta\Delta C_{T \text{ amostra}} = \Delta C_{T \text{ amostra}} - \Delta C_{T \text{ curva}}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_{T \text{ amostra}}} = \text{razão T/S}$$

4.2.13 Sequenciamento de nova geração

O DNA extraído na etapa 4.2.11 foi quantificado no Qubit 4.0. A pureza foi verificada no NanoDrop 2000 e a integridade, no gel de agarose. Amostras degradadas e/ou com razão A260/280 <1,8 e >2,1 foram excluídas.

Foi utilizado 15 ng de cada amostra de DNA para preparo da biblioteca. O DNA foi fragmentado utilizando o *QIAseq Targeted DNA Panels kit*, conforme especificação do fabricante. Foram adicionados adaptadores contendo uma sequência complementar, um primer universal e o UMI. Os fragmentos foram amplificados usando o *single primer* específico para os genes alvo (tabela 15). Posteriormente, foram adicionados os índices, junto às sequências compatíveis com os sequenciadores Illumina. O tamanho médio dos fragmentos das bibliotecas foi de 433 pb, quantificados no *Fragment Analyzer*.

As bibliotecas foram normalizadas e sequenciadas no *Miseq System* (Illumina) pair end (2x150 bp). Os arquivos gerados foram carregados no *CLC Genomics Workbench* (Qiagen). Utilizando o pipeline *Biomedical Genomics Analysis* (versão 22.0) as sequências foram alinhadas ao genoma de referência GRCh37/hg19, as variantes foram chamadas e anotadas. As variantes foram classificadas conforme critérios do ACMG (do inglês, *American College of Medical Genetics and Genomics*) (RICHARDS; AZIZ; BALE; BICK *et al.*, 2015).

Tabela 15. Lista de genes/éxons sequenciados

Ref Seq	Gene	Exon
NM_022552	<i>DNMT3A</i>	23
NM_001127208	<i>TET2</i>	Todos
NM_001203247	<i>EZH2</i>	Todos
NM_001282386	<i>IDH1</i>	4
NM_002168	<i>IDH2</i>	4
NM_015338	<i>AXSL1</i>	Todos
NM_012433	<i>SF3B1</i>	14 e 15

NM_001195427	<i>SRSF2</i>	1
NM_006758	<i>U2AF1</i>	2 e 6
NM_005089	<i>ZRSR2</i>	Todos
NM_000489	<i>ATRX</i>	16
NM_000546	<i>TP53</i>	Todos
NM_198253	<i>TERT</i>	Região promotora
NM_004364	<i>CEBPA</i>	Todos
NM_001001890	<i>RUNX1</i>	Todos

4.2.13 Sequenciamento por Sanger

O DNA plasmidial extraído foi submetido a sequenciamento por Sanger para confirmar a inserção correta dos insertos e analisar possíveis alterações nas sequências de DNA oriundas da manipulação durante a fase de clonagem e expansão dos vetores.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* conforme protocolo do fabricante. A proporção dos reagentes utilizados está descrita na tabela 15. O programa do termociclador está descrito na tabela 16.

Tabela 16. Lista de reagentes da reação de Sanger.

Reagente	Volume (1x)
DNA (50 ng/ μ L)	2 μ L
Buffer BigDye	2 μ L
BigDye	1 μ L
Primers (10 μ M)	0,5 μ L
Água ultrapura	4,5 μ L

Tabela 17. Programa no termociclador para sequenciamento por Sanger.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	1 min	1x
95°C	10 seg	25x
51°C	5 seg	
60°C	4 minutos	
4°C	∞	1x

4.2.14 imunofluorescência para detecção de R-loops e gama H2AX

Para a marcação de R-loops, 100.000 células de cada linhagem NB4-vazio-GFP, NB4-RNaseH1-GFP, THP1-vazio-GFP, THP1-RNaseH1-GFP e VA13 foram aderidas a lâminas de microscópio (*Shandon Cytoslide*) através de centrifugação a 400 x g por 1 min. Os esfregaços foram secados em ar ambiente no escuro por 5 min, e os *pellets* de células foram demarcados com DAKO pen. As células foram fixadas com 100 µL do *BD Cytofix/Cytoperm buffer* por 15 min no gelo. Os esfregaços foram lavados 2 vezes com o *BD Perm/Wash buffer*. As células foram permeabilizadas com 100 µL de 0,3% Triton X-100 diluído em PBS por 15 min no gelo. Novamente, os esfregaços foram lavados 2 vezes com o *BD Perm/Wash buffer*. As células foram tratadas com 100 µL do *BD Cytoperm Plus Buffer* por 10 min no gelo, lavadas novamente com o *BD Perm/Wash buffer* por 2 vezes. As células foram fixadas com 2% de SAB com 0,3% Tritonx-100 diluídos em PBS por 1 h em temperatura ambiente. O esfregaço foi lavado com o *BD Perm/Wash buffer*. Foi adicionado 50 µL do anticorpo primário S9.6 (Kerafast) diluído na solução de bloqueio na concentração de 1:300 e deixado durante 16h a 4°C. Os esfregaços foram lavados 5 vezes com o *BD Perm/Wash buffer* e depois incubados com 1:1000 do anticorpo secundário, AF594 anti coelho (ThermoFisher) e com DAPI 1:1000 diluídos na solução de bloqueio por 1 h a temperatura ambiente. A lamínula foi adicionada ao esfregaço aplicando 20 µL do Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences).

Para marcação do gama H2AX, 100.000 células de cada linhagem NB4-vazio-GFP, NB4-RNaseH1-GFP, THP1-vazio-GFP, THP1-RNaseH1-GFP e VA13 foram

aderidas a lâminas de microscópio (*Shandon Cytoslide*) através de centrifugação a 400 x g por 1 min. Os esfregaços foram secados em ar ambiente no escuro por 5 min, e os *pellets* de células foram demarcados com DAKO pen. As células foram fixadas com 100 µL de metanol absoluto por 20 min a -20°C. Os esfregaços foram lavados 3 vezes com PBST (PBS + 0,01% Tween 20). As células foram permeabilizadas com 100 µL de 0,3% Triton X-100 diluído em PBS por 15 min no gelo. Novamente, os esfregaços foram lavados 3 vezes com PBST. As células foram fixadas com 2% de SAB com 0,3% Tritonx-100 diluídos em PBS por 1 h em temperatura ambiente. O esfregaço foi lavado com o PBST. Foi adicionado 50 µL do anticorpo primário gama H2AX (Abcam) diluído na solução de bloqueio na concentração de 1:300 e deixado durante 16h a 4°C. Os esfregaços foram lavados 3 vezes com PBST e depois incubados com 1:1000 do anticorpo secundário, AF594 anti coelho (ThermoFisher) e com DAPI 1:1000 diluídos na solução de bloqueio por 1 h a temperatura ambiente. A lamínula foi adicionada ao esfregaço aplicando 20 µL do Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences).

As imagens foram capturadas no microscópio confocal Zeiss LSM (Laser scanning microscope) 710 e analisadas no software Fiji (ImageJ) (SCHINDELIN; ARGANDA-CARRERAS; FRISE; KAYNIG *et al.*, 2012).

4.2.14 Pacientes

Para a coorte de LMA deste estudo foram selecionados retrospectivamente 99 pacientes incluídos consecutivamente nos estudos ICAML (*International Consortium on Acute Myeloid Leukemia*) e ICAPL (*International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia*), de 8 centros participantes, entre dezembro/2015 a janeiro/2020.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição e conduzido conforme a Declaração de Helsinki. Os critérios de elegibilidade incluíam: 1) pacientes > 18 anos; 2) diagnóstico de LMA conforme a classificação da OMS 2016 e 3) quantidade de material de DNA e RNA suficientes para a realização dos experimentos propostos.

4.2.15 Viabilidade celular com MTT formazan

As linhagens celulares transduzidas foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de citarabina (300, 600, 1200, 2400, 4800, 9600 e 19200 nM) a 37°C por 48 h. Após, 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada em cada poço, sendo incubadas a 37°C por 4 h. Após este período, os cristais de formazan foram

diluídos em 100 μ L de isopropanol acidificado e a absorbância aferida a 570 nm em um leitor de microplaca. Os dados foram coletados para o cálculo de IC50.

4.2.16 Análise estatística

A clusterização das LMAs utilizando a expressão de TERRA foi realizada no software ClustVis (METSALU; VILO, 2015).

As análises estatísticas foram realizadas no Prism-Graphpad (versão 9). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as análises de variáveis não paramétricas. Para comparação de variáveis paramétricas foi utilizado o teste t de *student*. Para análise da proporção entre os diferentes grupos foi calculado o IC95% utilizando o método de Wilson/Brown e os grupos foram comparados pelo teste de chi-quadrado.

O IC50 foi calculado por regressão linear e análise comparativa entre todos os experimentos foi realizada por teste de variância (*two way* ANOVA), seguido por teste de Tukey.

5. Resultados

5.1 A expressão de TERRA na LMA é desregulada

Foram selecionados inicialmente 98 pacientes para a coorte de LMA; contudo, 9 pacientes foram excluídos devido a qualidade e/ou quantidade das amostras de DNA e RNA. Dos 9 pacientes excluídos, 4 pacientes possuíam diagnóstico de LMA não-LPA e 5 possuíam diagnóstico de LPA. As principais características dos pacientes incluídos nesta coorte estão descritas na tabela abaixo (Tabela 18).

Tabela 18. Principais características dos pacientes com LMA incluídos.

Variável	Número
Idade (anos)	43,6 (18-74)
Sexo (%)	
Masculino	50%
Feminino	50%
Classificação de LMA (%)	
Leucemia promielocítica aguda	27%
LMA com NPM1 mutado	15%
LMA com <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9%
LMA com <i>CBFB-MYH11</i>	5%
LMA com mutação bialélica do <i>CEBPA</i>	2%
Outras LMA com alterações genéticas recorrentes	2%
LMA sem outras especificações	40%
Estratificação de risco para as LMAs não LPA conforme ELN 2017 (%)	
Favorável	34%
Intermediário	36%
Desfavorável	30%

Estratificação de risco para as LPAs conforme GINEMA / PETHEMA 2000 (%)	
Favorável	4%
Intermediário	15%
Desfavorável	81%

Para analisar o perfil de expressão dos TERRAs nas LMAs, foi realizado análise por clusterização hierárquica baseada na expressão dos TERRAs utilizando o ClusterVis (METSALU; VILO, 2015). O agrupamento das linhas e das colunas foi não supervisionado e utilizou a distância euclidiana (figura 16). A análise demonstrou a formação de dois grupos de LMA, um com baixa expressão de TERRA e outro com alta expressão de TERRA.

A partir desta primeira análise, a expressão relativa de cada gene (*TERRA* 10q, 15, 20q, XqYq, 17p e XpYp, *TERT*, *TRF2*, *ASXL1*, *RNASEH1*, *RNASEH2*) foi comparada entre os dois grupos.

O perfil de metilação é frequentemente anormal em LMAs, incluindo padrões de metilação em ilhas CpG (BULLINGER; EHRICH; DÖHNER; SCHLENK *et al.*, 2010; DENEBERG; GRÖVDAL; KARIMI; JANSSON *et al.*, 2010; KROEGER; JELINEK; ESTÉCIO; HE *et al.*, 2008). A expressão dos TERRAs é regulada a partir da metilação das ilhas CpG, sendo que os TERRAs 10q, 15q, 20q e XqYq apresentam ilhas CpG e os TERRAs 17p e XpYp não possuem ilhas CpG (FERETZAKI; RENCK NUNES; LINGNER, 2019; TOUBIANA; GAGLIARDI; PAPA; MANCO *et al.*, 2019; TOUBIANA; SELIG, 2020). A comparação entre os dois grupos de LMA demonstrou que a expressão relativa dos TERRAs foi significativamente maior no grupo com alta expressão de TERRA, independente da presença de ilhas CpG, com exceção do TERRA 17p ($p = 0,07$), que demonstrou uma tendência ao aumento no subgrupo de LMA com maior expressão de TERRA (Figura 17).

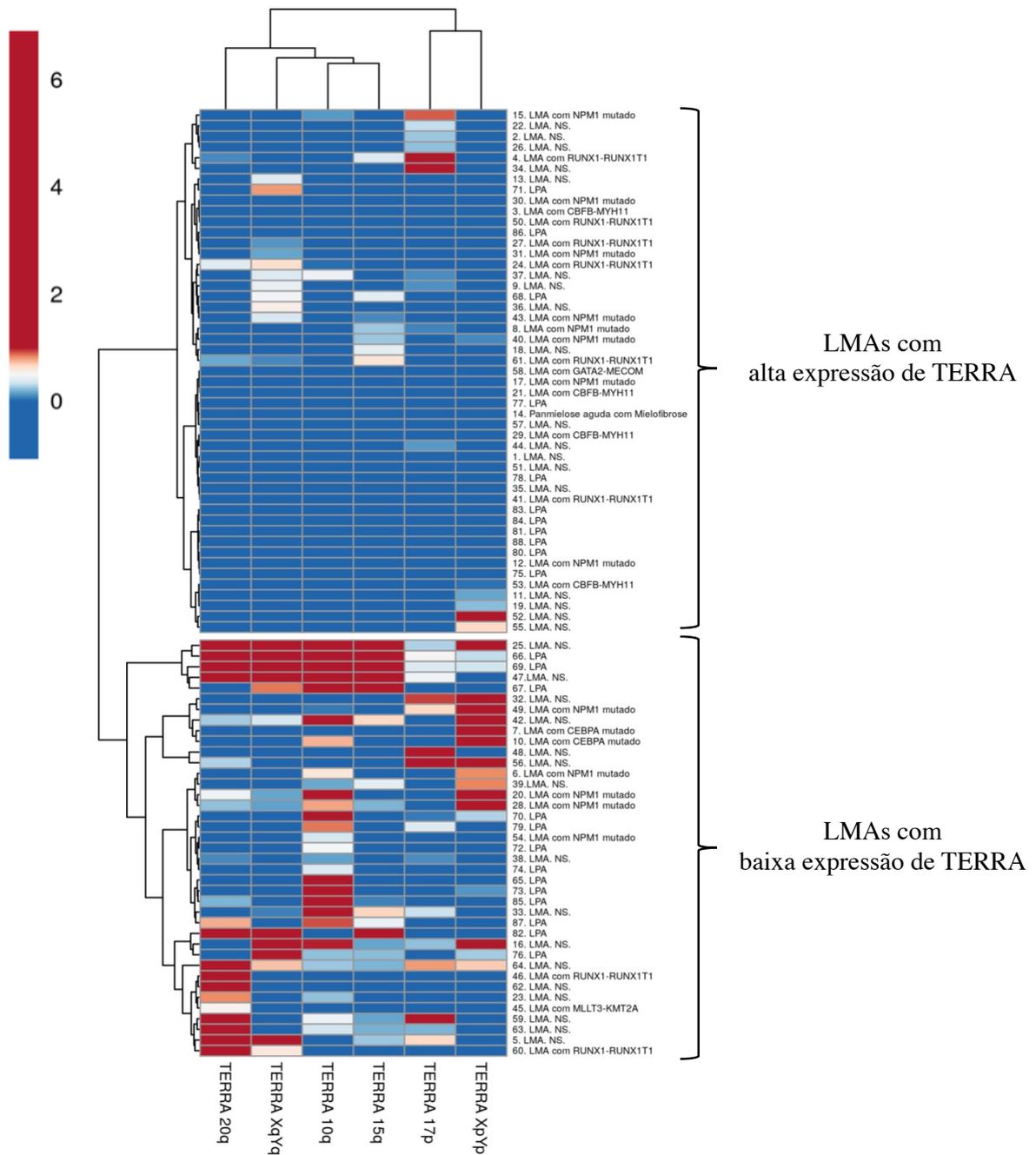


Figura 16. Análise por clusterização hierárquica, utilizando a distância euclidiana para as variáveis da linha e da coluna. A clusterização mostra dois grupos de LMA, um com alta expressão de TERRA e outro com baixa expressão de TERRA.

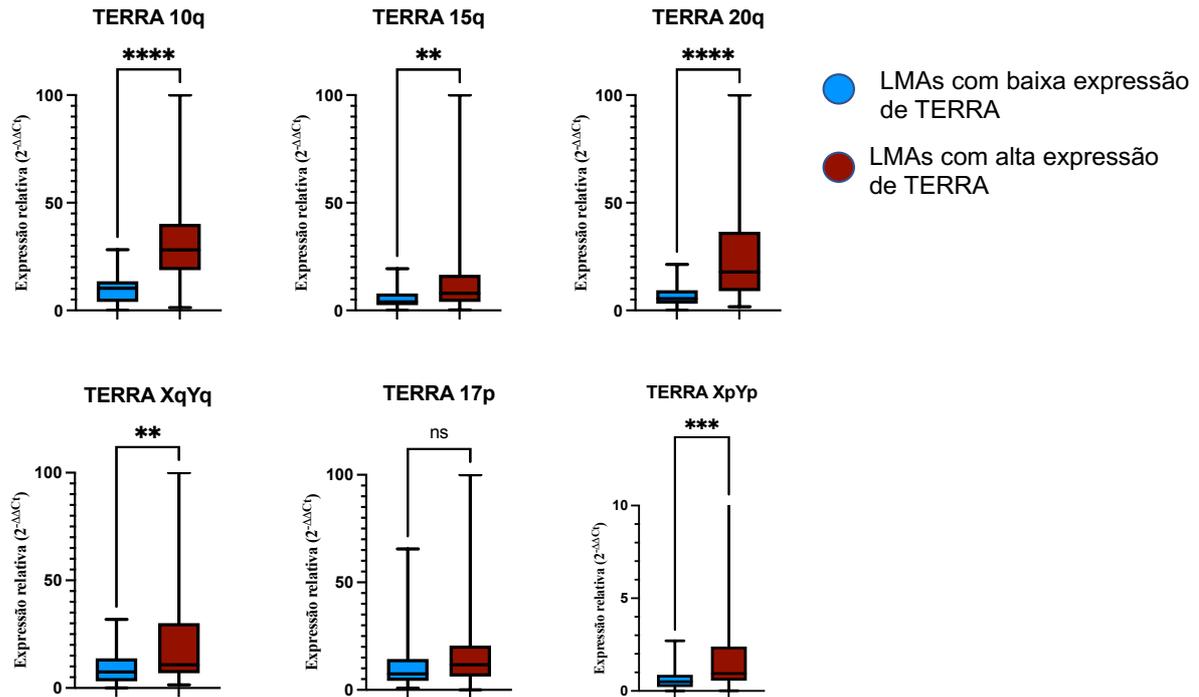


Figura 17. Expressão relativa de TERRA 10q, 15q, 20q, XqYq, 17p e XpYp em LMAs com baixa ou alta expressão de TERRA. O grupo de LMA com alta expressão de TERRA possui aumento de todos os TERRAs estudados.

Mutações em genes relacionados ao controle epigenético e a fatores de *splicing* são frequentemente encontradas em LMA e poderiam justificar a diferença encontrada na expressão de TERRA dos dois grupos (LINDSLEY; MAR; MAZZOLA; GRAUMAN *et al.*, 2015; PAPAEMMANUIL; GERSTUNG; BULLINGER; GAIDZIK *et al.*, 2016). Para analisar o impacto dessas mutações no perfil de expressão de TERRA, foi realizado um painel de sequenciamento de nova geração. Dos 88 pacientes incluídos na coorte, 79 foram submetidos ao sequenciamento de nova geração, sendo que 32 pacientes (40%) apresentavam variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em reguladores epigenéticos e/ou fatores de *splicing*. A distribuição das mutações está demonstrada na figura 18.

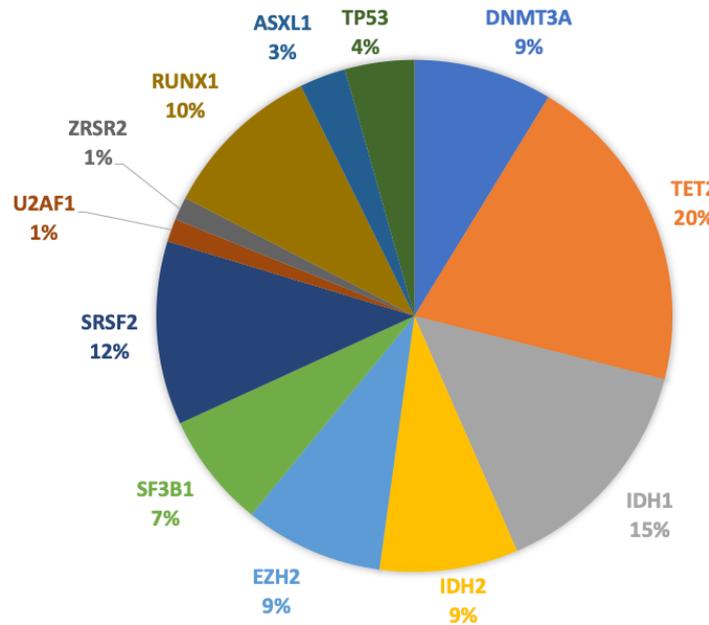


Figura 18. Distribuição das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas na coorte de LMA não-LPA.

A análise das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas nos dois grupos revelou que as mutações em genes de *splicing* são raras no grupo com alta expressão de TERRA (OR: 4.5; IC95%: 1.19-15.92); não houve diferença em relação a mutações em reguladores epigenéticos entre ambos os grupos (figura 19).

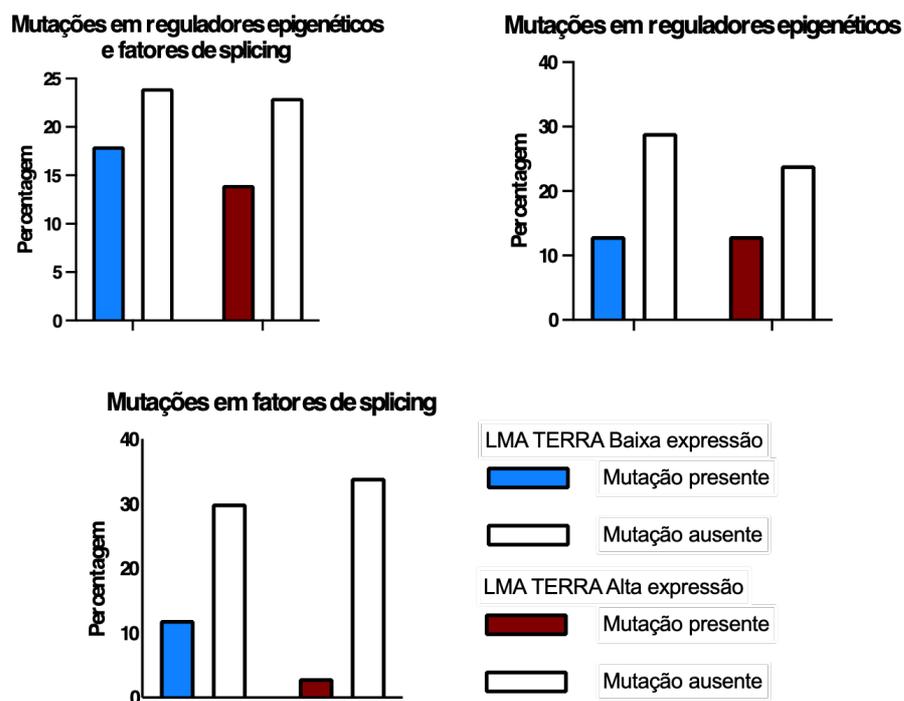


Figura 19. Distribuição das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas nos diferentes grupos de LMA. O grupo com alta expressão de TERRA possui menos mutações em fatores de splicing.

O painel de NGS foi também utilizado para reclassificar o risco intermediário. Primeiro, foram comparadas mudanças da classificação entre o ELN2017 e ELN2022 (DÖHNER; ESTEY; GRIMWADE; AMADORI *et al.*, 2017; DÖHNER; WEI; APPELBAUM; CRADDOCK *et al.*, 2022). Dos 11 pacientes com risco intermediário classificados pelo ELN 2017, 2 pacientes (18%) possuíam mutações associadas a mal prognóstico, o primeiro com três mutações no *EZH2* (NM_001203247.2, :c.1782G>C, p.Trp594Cys; c.1382A>G, p.Lys461Arg; c.1339T>A, p.Tyr447Asn) e o segundo com uma mutação no *ZRSR2* (NM_005089.4 c.1035del, p.Asp345Glufs). Em seguida, foram comparadas a estratificação de risco utilizada nos centros participantes do ICAML, ELN2010, com a classificação mais atual de 2022. Dos 22 pacientes com risco intermediário classificados pelo ELN2010, 8 pacientes (36%) foram reclassificados como alto risco.

Foi analisada a distribuição dos pacientes dos grupos de LMA baseada na expressão de TERRA com a estratificação de risco do ELN2017. A análise demonstrou que não há diferença estatística na proporção dos pacientes com riscos baixo, intermediário e alto classificados pelo ELN2017 em relação aos dois grupos de LMA classificados pela expressão de TERRA (figura 18).

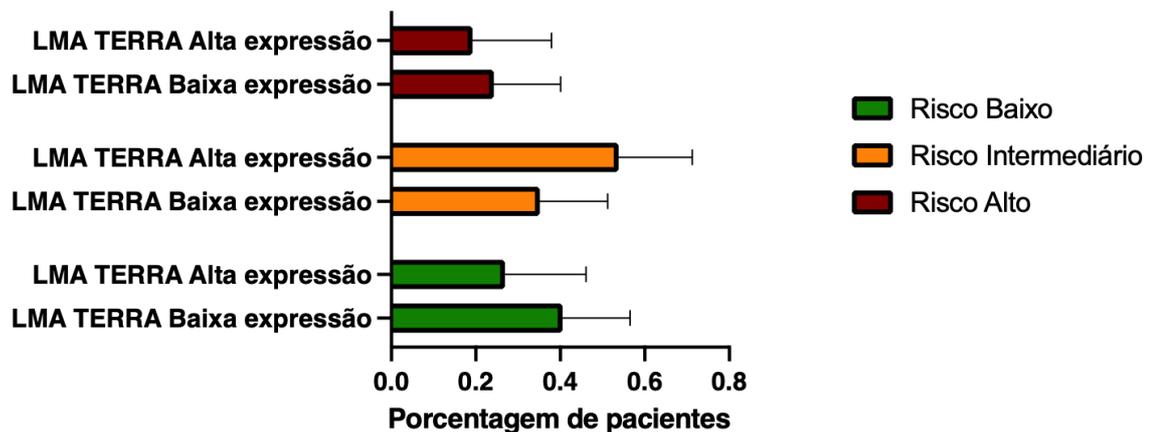


Figura 20. Proporção dos pacientes classificados como risco baixo, intermediário e alto nas LMAs com alta e baixa expressão de TERRA. O IC95% foi calculado através do método de Wilson/Brown.

Estudos prévios demonstram uma relação inversa entre a expressão de *TRF2* e de *ATRX* com a expressão de TERRA (CHU; CIFUENTES-ROJAS; KESNER; AEBY *et al.*, 2017; PORRO; FEUERHAHN; DELAFONTAINE; RIETHMAN *et al.*, 2014). A expressão de

TRF2 e *ATRX* foi avaliada para averiguar esta correlação nas amostras de LMA; sendo os níveis de expressão semelhantes para estes genes entre os dois grupos (figura 1921).

Os níveis de R-loops de TERRA são controlados durante o ciclo celular pelas RNaseH1 e RNaseH2 (LOCKHART; PIRES; BENTO; KELLNER *et al.*, 2019). Foi avaliado a expressão dessas RNaseHs nos dois grupos de LMA, sendo que o grupo com alta expressão de TERRA apresentou menor expressão de *RNaseH2*. Não houve diferença na expressão de *RNaseH1* entre os grupos (figura 21).

Por fim, foi analisada a relação entre o comprimento telomérico e a expressão de *TERT* com a expressão de TERRA nos dois grupos de LMA. A análise do comprimento telomérico demonstrou que as LMAs se caracterizam por um comprimento telomérico curto, sendo que não houve diferença entre os grupos. Já a expressão de *TERT* foi menor no grupo de LMA com alta expressão de TERRA quando comparado ao outro grupo (figura 21).

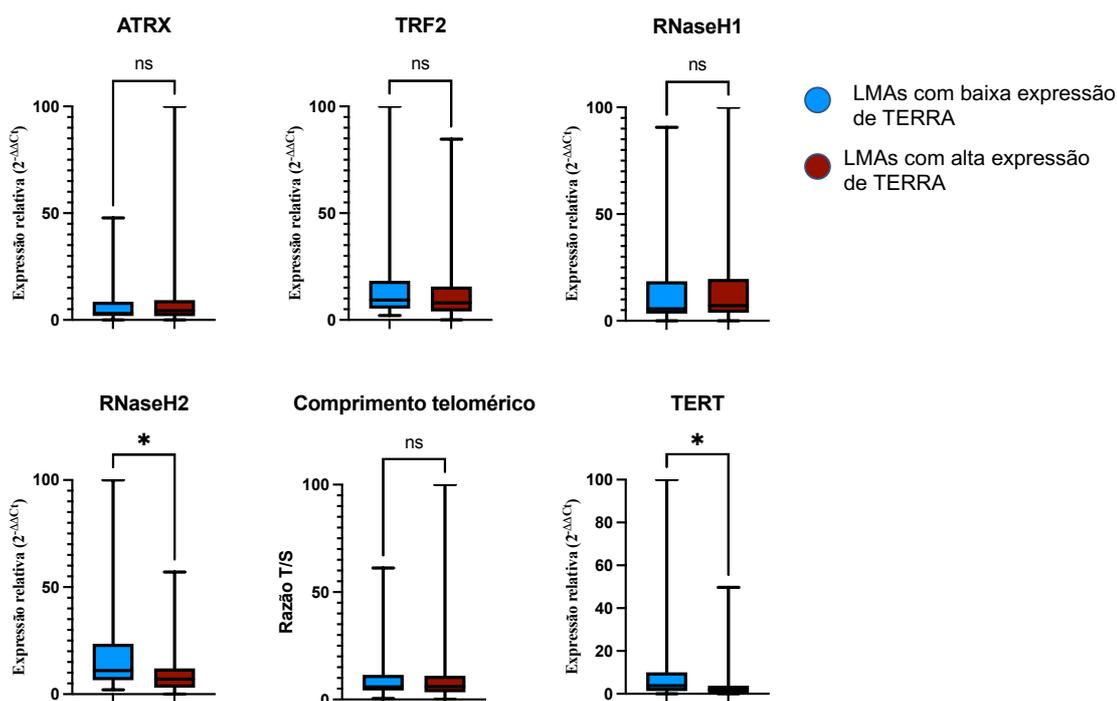


Figura 21. Análise da expressão de *ATRX*, *TRF2*, *RNaseH1*, *RNaseH2*, comprimento telomérico e *TERT* entre os dois grupos de LMA. O grupo com alta expressão de TERRA possui expressão reduzida de *RNaseH2* e *TERT*.

Os dados demonstram que as LMAs com alta expressão de TERRA possuem menor expressão de *RNaseH2* e *TERT* e, além disso, a presença de mutações em fatores de *splicing* é rara nesse grupo.

5.2 A superexpressão de *RNaseH1* está associada a maior quimiossensibilidade a citarabina

Para analisar a função do TERRA e dos R-loops em LMA, foram selecionadas duas linhagens celulares leucêmicas (NB4 e THP1), sendo a escolha baseada na prevalência dos principais subtipos de LMA na coorte: LMA com diferenciação monocítica e LPA. As mesmas foram transduzidas com um vetor lentiviral contendo *RNaseH1*-GFP, com o intuito de superexpressar *RNaseH1*, proteína que promove a degradação de R-loops. Além disso, células foram transduzidas com um vetor contendo GFP porém sem a *RNaseH1*, sendo o controle dos experimentos. Após a transdução, as linhagens foram denominadas NB4-*RNaseH1*-GFP, NB4-vazio-GFP, THP1-*RNaseH1*-GFP e THP1-vazio-GFP.

Inicialmente, foi avaliado o perfil de expressão dos genes *ATRX*, *TERT*, *RNaseH1*, *RNaseH2*, *TERT* e *TERRA* (10q, 15q, 20q, XqYq, 17p e XpYp) das culturas celulares com diferença temporal de 7 dias a fim de avaliar a estabilidade da expressão dos diferentes genes. Os resultados de RT-qPCR demonstraram aumento significativo da expressão de *RNaseH1* nas linhagens transduzidas com vetor *RNaseH1*-GFP quando comparadas às linhagens transduzidas com vetor vazio-GFP (figura 22). Não houve alteração significativa da expressão dos outros genes analisados. (figura 22).

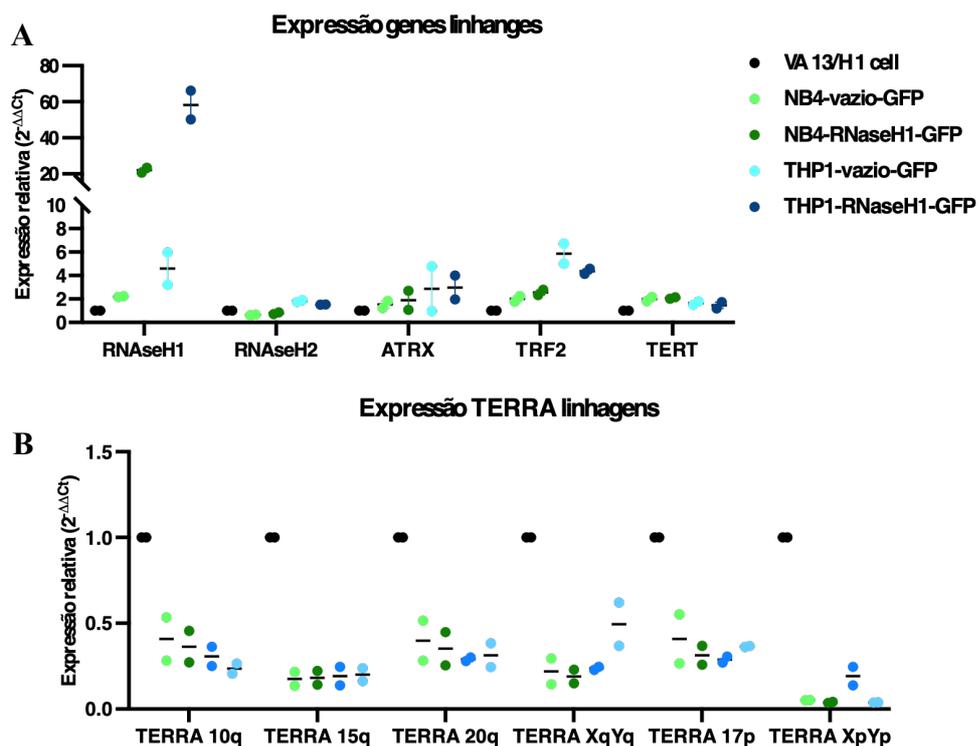


Figura 22. Expressão de *RNaseH1*, *RNaseH2* e genes da biologia dos telômeros em linhagens transduzidas. A) Análise da expressão de *ATRX*, *TRF2*, *RNaseH1*, *RNaseH2* e *TERT*, e comprimento telomérico em linhagens celulares cultivadas por 7 dias. O gráfico demonstra superexpressão sustentada de *RNaseH1* nas linhagens transduzidas com o vetor lentiviral RNaseH1-GFP. B).

Para avaliar o efeito da superexpressão de RNaseH1 nas linhagens celulares, a presença de R-loops foi verificada por imunofluorescência, utilizando um anticorpo que detecta híbridos de DNA:RNA (S9.6). Foram analisadas pelo menos 60 imagens de cada linhagem, através da captura de no mínimo 10 células e de 10 *z-stacks* a fim de avaliar a colocalização e intensidade de fluorescência entre DAPI e S9.6. O dados demonstram diminuição da quantidade de R-loops nas linhagens com superexpressão de RNaseH1 (figura 23).

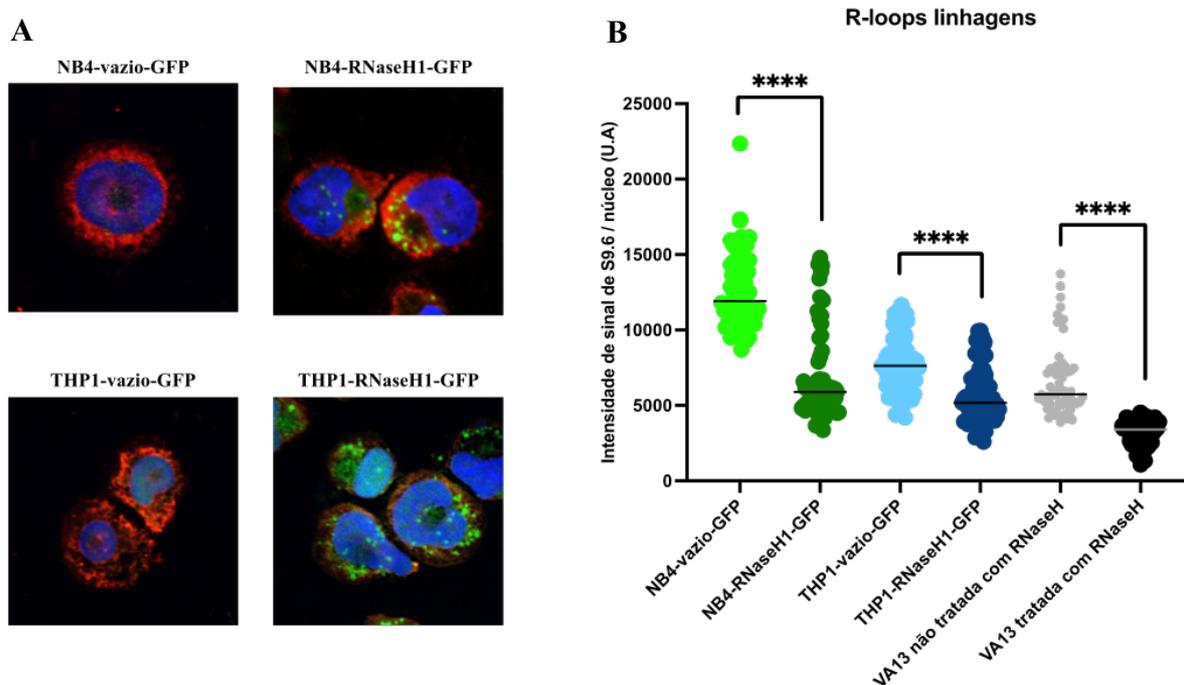


Figura 23. A) Imagens demonstrando as linhagens transduzidas com marcação do anticorpo S9.6; em azul, os núcleos (DAPI), em verde, as proteínas GFP associadas ou não a RNaseH1, e em vermelho, a marcação pelo S9.6 (AF594). B) Quantificação da intensidade de sinal de S9.6..

Os níveis de R-loops devem ser homeostáticos; níveis desregulados de R-loops são associados a lesão do DNA e disfunção telomérica (GARCIA-MUSE; AGUILERA, 2019; WELLS; WHITE; STIRLING, 2019).

As linhagens celulares foram tratadas com diferentes doses de citarabina, a fim de avaliar o impacto funcional da diminuição dos R-loops no contexto do tratamento quimioterápico. Para esta análise, foi avaliada a viabilidade celular com MTT e calculada o

IC50. Neste caso, o IC50 indica o nível de citarabina capaz de reduzir a viabilidade celular das diferentes linhagens a 50% em relação a viabilidade inicial. Os resultados do MTT demonstram que as linhagens que superexpressam RNaseH1 possuem menor IC50 e, conseqüentemente, demonstram maior sensibilidade à citarabina, quando comparadas aos respectivos controles (figura 24).

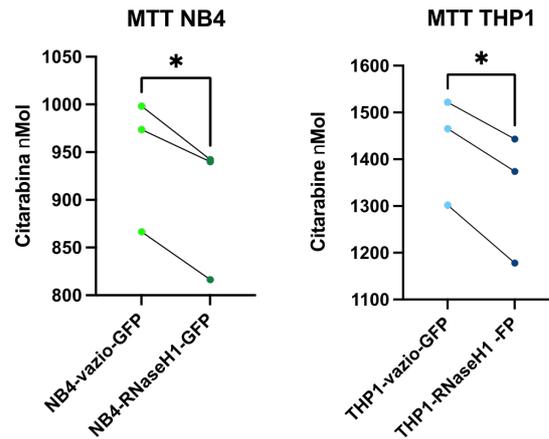


Figura 24. Os IC50 são inferiores para as linhagens que superexpressam RNaseH1, demonstrando maior quimiossensibilidade a citarabina.

6. Discussão

Neste trabalho identificamos que um subgrupo de LMAs se caracteriza por alta expressão de *TERRA*, baixa expressão de *RNaseH2* e *TERT*, e menor frequência de mutações em fatores de *splicing*.

Os telômeros regulam o processo de senescência e divisão celular. Em células saudáveis, o encurtamento telomérico desencadeia parada da divisão celular, senescência e apoptose (CALADO; YOUNG, 2009). Quando esta homeostase é adulterada, o processo de divisão celular continua e a função protetora dos telômeros é mitigada, com instabilidade cromossômica e encurtamento telomérico acelerado (MACIEJOWSKI; DE LANGE, 2017; MATHON; LLOYD, 2001). Nas células neoplásicas, o telômero pode ser estabilizado através da ativação da telomerase ou ativação das vias ALT.

Nossos dados demonstram que as LMAs são caracterizadas por comprimento telomérico curto e alta expressão de telomerase. Resultados semelhantes são descritos previamente (AALBERS; CALADO; YOUNG; ZWAAN *et al.*, 2013; CAPRARO; ZANE; PONCET; PEROL *et al.*, 2011; DRATWA; WYSOCZAŃSKA; BUTRYM; ŁACINA *et al.*, 2021; EL BELBESY; EL AGGAN; SULTAN; EL NAGGAR *et al.*, 2015; HARTMANN; BRÜMMENDORF; BALABANOV; THIEDE *et al.*, 2005). Neste contexto, a alta expressão de telomerase mantém o comprimento telomérico apesar da alta taxa de divisão celular (BROCCOLI; YOUNG; DE LANGE, 1995; ZHANG; PIATYSZEK; KOBAYASHI; ESTEY *et al.*, 1996).

Nas LMAs, a presença da mutação do promotor de *TERT* ou a hipometilação do mesmo explicam, em certos casos, o aumento da expressão de *TERT* e da atividade da telomerase (CALADO; REGAL; HILLS; YEWDELL *et al.*, 2009; LEE; LEÃO; KOMOSA; GALLO *et al.*, 2019). Corroborando esses resultados, nossos dados demonstram que as LMAs possuem alta expressão de *TERT*.

O encurtamento telomérico e a perda da função protetora dos telômeros nas LMAs podem estar associados à alta quantidade de evolução clonal com aquisições de novas alterações citogenéticas no decorrer do tratamento ou durante a recaída da doença (MORITA; WANG; JAHN; HU *et al.*, 2020; ONECHA; RAPADO; LUZ MORALES; CARRENO-TARRAGONA *et al.*, 2021; VOSBERG; GREIF, 2019).

Os *TERRAs* participam do controle do comprimento telomérico, regulam a atividade da telomerase, podem deflagrar as vias ALT, modulam a compactação do telômero e regulam a transcrição gênica através da interação com *ATRX* (KROUPA; TOMASOVA; KAVEC; SKROBANEK *et al.*, 2022).

Em diferentes linhagens celulares, o encurtamento telomérico estimula a produção de TERRA (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; MORAVEC; WISCHNEWSKI; BAH; HU *et al.*, 2016). O estudo prévio realizado por nosso grupo demonstra que tanto as LMAs como as telomeropatias possuem comprimento telomérico curto e sugere que apenas um subgrupo de LMAs apresenta alta expressão de TERRA (ZANELATTO, Leonardo Campos). Neste trabalho, mensuramos a expressão de TERRA em pacientes com LMA e demonstramos que o TERRA é superexpresso apenas em um subgrupo de LMA. O conjunto de dados do nosso grupo indica que, em células primárias, o encurtamento telomérico não estimula a expressão de TERRA.

A alta expressão de TERRA em um subgrupo de LMAs pode auxiliar na manutenção dos telômeros através do recrutamento da telomerase em cis e, por consequência, prevenir a senescência replicativa das células blásticas (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; WANG; XIAO; ZHANG; WANG *et al.*, 2014). Adicionalmente, a formação de R-loops em telômeros criticamente curtos pode deflagrar a ativação de vias ALT, promovendo o alongamento telomérico (GRAF; BONETTI; LOCKHART; SERHAL *et al.*, 2017).

Os dados compilados dos dois trabalhos realizados pelo nosso grupo também demonstram que a expressão do TERRA não está relacionada ao fenótipo leucêmico/neoplásico, visto que pacientes com LLA e um subgrupo dos pacientes com LMA não apresentam aumento da expressão de TERRA (ZANELATTO, Leonardo Campos).

Dados prévios demonstram que a expressão do TERRA é modulada, na maioria dos cromossomos, a partir da metilação das ilhas CpG. As regiões subteloméricas são metiladas durante o início do desenvolvimento embrionário pela DNMT3B, reduzindo a expressão de TERRA. (FERETZAKI; RENCK NUNES; LINGNER, 2019; TOUBIANA; SELIG, 2020). Corroborando esse fato, estudos prévios demonstram que as células do sangue periférico possuem a região subtelomérica hipermetilada (DE LANGE; SHIUE; MYERS; COX *et al.*, 1990).

Anormalidades do padrão de metilação, incluindo ilhas CpG, são frequentemente identificados em LMAs, (BULLINGER; EHRICH; DÖHNER; SCHLENK *et al.*, 2010; DENEKBERG; GRÖVDAL; KARIMI; JANSSON *et al.*, 2010; KROEGER; JELINEK; ESTÉCIO; HE *et al.*, 2008). A fim de estudar as possíveis relações entre a expressão de TERRA e a presença de mutações em genes de controle epigenético foi realizado o sequenciamento de nova geração. Os dados demonstram que não houve diferença estatística na

taxa de mutações nos genes de controle epigenéticos entre os grupos de LMA classificados pela expressão de TERRA.

Nosso estudo demonstrou que TERRAs estão superexpressos em um subgrupo de LMAs, independente da presença de ilhas CpG na região subtelomérica, visto que os TERRAs 10q, 15q, 20q e XqYq possuem ilhas CpG e os TERRAs 17p e XpYp não possuem ilhas CpG. Um estudo prévio, recentemente publicado, demonstra que o TERRA possui dois tipos de promotores, sendo apenas um deles regulado pela metilação do DNA (FERETZAKI; RENCK NUNES; LINGNER, 2019). Baseado em nossos dados, é provável que as diferenças nas expressões de TERRA nas LMAs não sejam decorrentes da metilação de ilhas CpG. Contudo, o presente estudo não avaliou o perfil de metilação das regiões subteloméricas dessas LMAs.

O TRF2 suprime a transcrição de TERRA através do domínio de homodimerização, sendo que a expressão de *TRF2* e TERRA apresentam relação inversa (PORRO; FEUERHAHN; DELAFONTAINE; RIETHMAN *et al.*, 2014). A expressão de *TRF2* nos dois grupos de LMA não é diferente e, portanto, não fundamenta a diferença encontrada na expressão de TERRA.

Ambos os grupos de LMA superexpressam *TRF2* quando comparados a VA-13. Estudos prévios demonstram que a superexpressão de *TRF2* protege os cromossomos criticamente curtos, inibindo a senescência celular (KARLSEDER; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2002; KLAPPER; QIAN; SCHULTE; PARWARESCH, 2003). Nossos dados sugerem que a superexpressão de *TRF2* associada a superexpressão de *TERT* corrobora na manutenção dos cromossomos criticamente curtos nas LMAs.

A perda da função de ATRX ou a diminuição de sua expressão está associada a diminuição da atividade da telomerase, instabilidade telomérica e alongamento telomérico por via ALT (LOVEJOY; LI; REISENWEBER; THONGTHIP *et al.*, 2012; RAMAMOORTHY; SMITH, 2015; TENG; SUNDARESAN; O'HARA; GANT *et al.*, 2021). O ATRX degrada G quadruplexes, estruturas secundárias em hélice do DNA ricas em guanina (BOCHMAN; PAESCHKE; ZAKIAN, 2012; KOSIOL; JURANEK; BROSSART; HEINE *et al.*, 2021), permitindo o alongamento telomérico telomerase-dependente (TENG; SUNDARESAN; O'HARA; GANT *et al.*, 2021). Nossos dados demonstram que as LMAs possuem alta expressão de *ATRX*. A alta expressão de *ATRX*, associada à alta expressão de *TRF2* e *TERT*, indica que as LMAs promovem o alongamento telomérico por meio da telomerase.

A RNaseH2 degrada R-loops, sobretudo durante a fase S do ciclo celular (LOCKHART; PIRES; BENTO; KELLNER *et al.*, 2019). Além disso, foi demonstrado que o TERRA é capaz de direcionar o complexo da telomerase aos telômeros criticamente curtos, promovendo o alongamento telomérico (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013). As LMAs que superexpressam TERRA possuem menor expressão de *TERT* e de *RNaseH2*. Neste grupo de pacientes, a reduzida expressão de *RNaseH2* pode promover a manutenção de R-loops durante a fase S, aumentando a quantidade de quebras de DNA e promovendo ativação de vias de reparo e alongamento telomérico independente da atividade da telomerase (GRAF; BONETTI; LOCKHART; SERHAL *et al.*, 2017; LOCKHART; PIRES; BENTO; KELLNER *et al.*, 2019). Adicionalmente, os TERRAs podem trafegar os complexos de telomerase para os telômeros criticamente curtos promovendo o alongamento telomérico em *cis* (MORAVEC; WISCHNEWSKI; BAH; HU *et al.*, 2016).

A distribuição dos diferentes tipos de LMAs na nossa coorte é diferente da encontrada em coortes europeias e dos EUA, com maior quantidade de pacientes com LPA e LMA mielomonocítica (DÖHNER; ESTEY; GRIMWADE; AMADORI *et al.*, 2017; DÖHNER; WEI; APPELBAUM; CRADDOCK *et al.*, 2022). Contudo, a maior prevalência de LPA já é descrita na população da América Latina, com uma proporção de casos em estudos prévios semelhantes ao encontrado em nosso estudo (DOUER; PRESTON-MARTIN; CHANG; NICHOLS *et al.*, 1996; REGO; JACOMO, 2011). Em relação à maior prevalência de LMA com diferenciação monocítica, isto parece ser uma característica nas LMAs não-LPAs na América Latina; contudo, esses dados ainda não foram publicados pelo IC-AML.

A maioria dos estudos que investigam os efeitos dos R-loops, sobretudo os R-loops de TERRA, se baseiam na depleção ou na superexpressão de *RNaseH1* (ARORA; LEE; WISCHNEWSKI; BRUN *et al.*, 2014; BALK; MAICHER; DEES; KLERMUND *et al.*, 2013; MISINO; BONETTI; LUKE-GLASER; LUKE, 2018). Os níveis de R-loops devem ser ótimos para a adequada homeostase celular; tanto altos como baixos níveis de R-loops estão associados a lesão do DNA (GARCIA-MUSE; AGUILERA, 2019; WELLS; WHITE; STIRLING, 2019). A diminuição da expressão de *RNaseH1* promove aumento dos R-loops, lesão do DNA e encurtamento telomérico (ARORA; LEE; WISCHNEWSKI; BRUN *et al.*, 2014). Já a superexpressão de *RNaseH1* diminui a quantidade de R-loops de TERRA, provocando encurtamento telomérico e senescência celular (BALK; MAICHER; DEES; KLERMUND *et al.*, 2013).

A fim de avaliar o impacto da diminuição de R-loops em LMAs, foi realizada a transdução de duas linhagens celulares de LMA (NB4 e THP1) com vetores lentivirais

contendo *RNaseH1*. A superexpressão de *RNaseH1* resultou em diminuição dos R-loops e maior quimiossensibilidade a citarabina. Em conjunto, esses resultados sugerem que a inibição dos R-loops é um possível alvo terapêutico nas LMAs.

A utilização de R-loops como alvo terapêutico tem sido recentemente estudada (CRISTINI; GROH; KRISTIANSEN; GROMAK, 2018; WANG; GRUNSEICH; FOX; BURDICK *et al.*, 2018). Estudos recentes em sarcomas (Ewing e sinovial) demonstraram que os inibidores de ATR são mais eficazes em pacientes que possuem maior quantidade de R-loops (JONES; FLEUREN; FRANKUM; KONDE *et al.*, 2017; NIETO-SOLER; MORGADO-PALACIN; LAFARGA; LECONA *et al.*, 2016). De modo semelhante, inibidores do PARP provocam maiores taxas de apoptose e lesão de DNA na presença de maiores quantidades de R-loops (WELLS; WHITE; STIRLING, 2019).

Em conjunto, nossos dados e os resultados de estudos prévios reforçam a teoria que os R-loops devem ser mantidos em níveis adequados e que tanto altos níveis como baixos níveis estão associados a lesão do DNA e encurtamento telomérico (WELLS; WHITE; STIRLING, 2019).

7. Conclusão

Nossos dados demonstram que a expressão de TERRA é desregulada em um subgrupo de LMAs, caracterizadas por menor expressão de *TERT* e de *RNaseH2*. Em relação a caracterização citogenética-molecular, as LMAs com alta expressão de TERRA possuem baixa quantidade de mutações em fatores de *splicing*. Nossos dados também demonstram que a inibição de R-loops pode ser utilizada como uma possível terapia alvo em pacientes com LMAs.

Um modelo para explicar essas associações está exposto abaixo (figura 25).

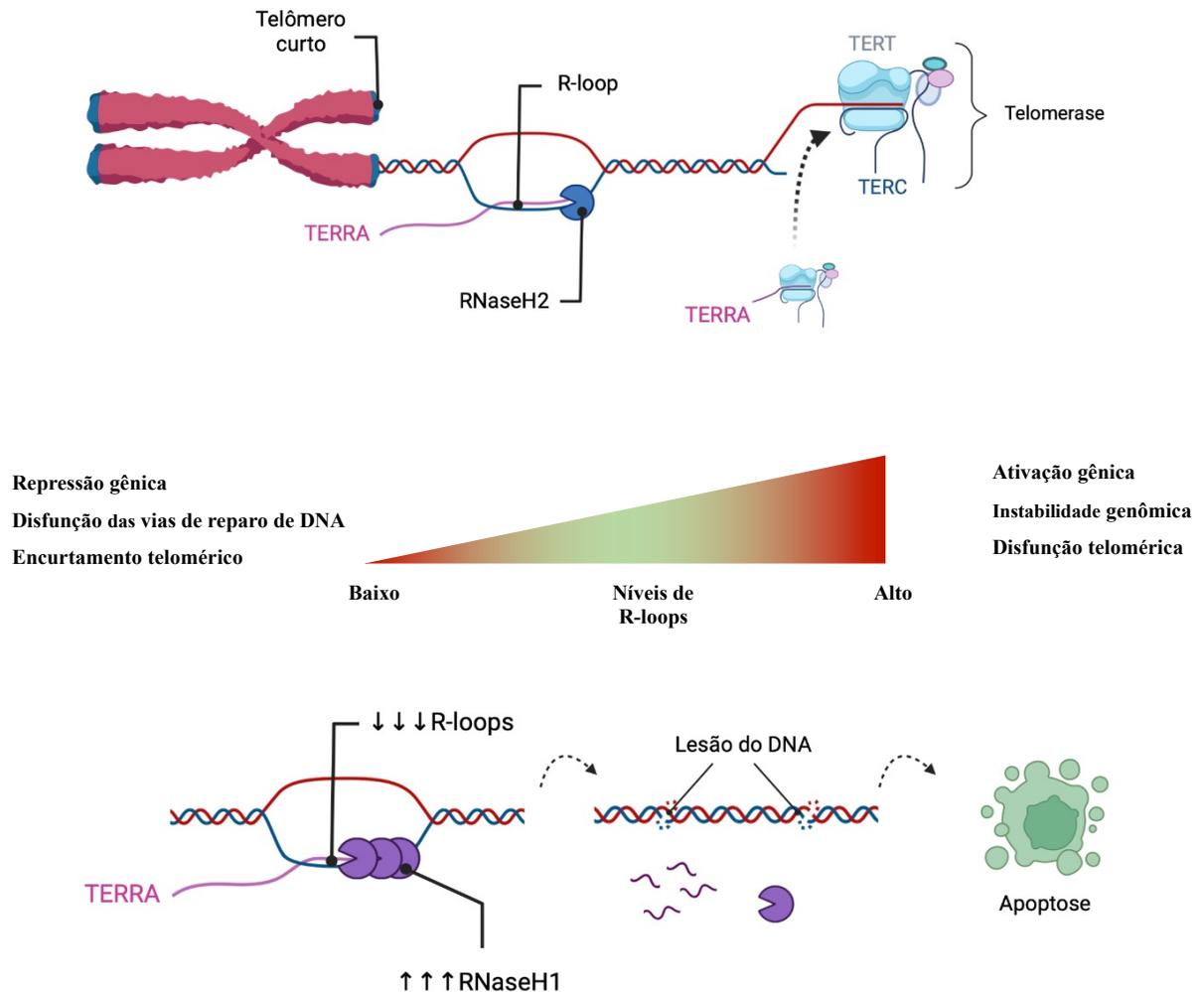


Figura 25. A) LMAs com superexpressão de TERRA apresentam baixa expressão de *RNaseH2* e *TERT*. Nessas LMAs a *RNaseH2* pode aumentar os R-loops de TERRA, quebra da dupla de DNA e ativar as vias ALT. Adicionalmente, os TERRAs podem conduzir o complexo da telomerase aos telômeros mais curtos. B) Tanto altos quanto baixos níveis de R-loops estão associados a lesão do DNA e encurtamento telomérico. C) A degradação dos R-loops através da superexpressão do *RNaseH1* está associada a maior quantidade de lesão do DNA (criado com BioRender.com).

8. Bibliografia

AALBERS, A. M.; CALADO, R. T.; YOUNG, N. S.; ZWAAN, C. M. *et al.* Telomere length and telomerase complex mutations in pediatric acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 27, n. 8, p. 1786-1789, Aug 2013.

ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R. P.; BOROWITZ, M. J. *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. **Blood**, 140, n. 11, p. 1200-1228, Sep 15 2022.

ARMANIOS, M. The Role of Telomeres in Human Disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, 23, p. 363-381, Aug 31 2022.

ARORA, R.; LEE, Y.; WISCHNEWSKI, H.; BRUN, C. M. *et al.* RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. **Nat Commun**, 5, p. 5220, Oct 21 2014.

AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomeres: the silence is broken. **Cell Cycle**, 7, n. 9, p. 1161-1165, May 1 2008.

AZZALIN, C. M.; REICHENBACH, P.; KHORIAULI, L.; GIULOTTO, E. *et al.* Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. **Science**, 318, n. 5851, p. 798-801, Nov 2 2007.

BALK, B.; MAICHER, A.; DEES, M.; KLERMUND, J. *et al.* Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. **Nat Struct Mol Biol**, 20, n. 10, p. 1199-1205, Oct 2013.

BLASCO, M. A. Telomere length, stem cells and aging. **Nature Chemical Biology**, 3, n. 10, p. 640-649, 2007/10/01 2007.

BOCHMAN, M. L.; PAESCHKE, K.; ZAKIAN, V. A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. **Nat Rev Genet**, 13, n. 11, p. 770-780, Nov 2012.

BROCCOLI, D.; YOUNG, J. W.; DE LANGE, T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 20, p. 9082-9086, Sep 26 1995.

BULLINGER, L.; EHRLICH, M.; DÖHNER, K.; SCHLENK, R. F. *et al.* Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. **Blood**, 115, n. 3, p. 636-642, 2010.

CALADO, R. T.; REGAL, J. A.; HILLS, M.; YEWDELL, W. T. *et al.* Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 4, p. 1187-1192, Jan 27 2009.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **N Engl J Med**, 361, n. 24, p. 2353-2365, Dec 10 2009.

CAPRARO, V.; ZANE, L.; PONCET, D.; PEROL, D. *et al.* Telomere deregulations possess cytogenetic, phenotype, and prognostic specificities in acute leukemias. **Exp Hematol**, 39, n. 2, p. 195-202 e192, Feb 2011.

CHU, H. P.; CIFUENTES-ROJAS, C.; KESNER, B.; AEBY, E. *et al.* TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. **Cell**, 170, n. 1, p. 86-101.e116, Jun 29 2017.

CRISTINI, A.; GROH, M.; KRISTIANSEN, M. S.; GROMAK, N. RNA/DNA Hybrid Interactome Identifies DXH9 as a Molecular Player in Transcriptional Termination and R-Loop-Associated DNA Damage. **Cell Rep**, 23, n. 6, p. 1891-1905, May 8 2018.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, 5, n. 3, p. 407-419, May-Jun 2014.

CUSANELLI, E.; ROMERO, CARMINA ANGELICA P.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, 51, n. 6, p. 780-791, 2013/09/26/ 2013.

DE LANGE, T. T-loops and the origin of telomeres. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 5, n. 4, p. 323-329, Apr 2004.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes Dev**, 19, n. 18, p. 2100-2110, Sep 15 2005.

DE LANGE, T. How telomeres solve the end-protection problem. **Science**, 326, n. 5955, p. 948-952, Nov 13 2009.

DE LANGE, T.; SHIUE, L.; MYERS, R. M.; COX, D. R. *et al.* Structure and variability of human chromosome ends. **Mol Cell Biol**, 10, n. 2, p. 518-527, Feb 1990.

DENEUBERG, S.; GRÖVDAL, M.; KARIMI, M.; JANSSON, M. *et al.* Gene-specific and global methylation patterns predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 24, n. 5, p. 932-941, May 2010.

DENG, Z.; NORSEEN, J.; WIEDMER, A.; RIETHMAN, H. *et al.* TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. **Mol Cell**, 35, n. 4, p. 403-413, Aug 28 2009.

DÖHNER, H.; ESTEY, E.; GRIMWADE, D.; AMADORI, S. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, 129, n. 4, p. 424-447, 2017.

DÖHNER, H.; WEI, A. H.; APPELBAUM, F. R.; CRADDOCK, C. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood**, 140, n. 12, p. 1345-1377, 2022.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

DOUER, D.; PRESTON-MARTIN, S.; CHANG, E.; NICHOLS, P. W. *et al.* High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. **Blood**, 87, n. 1, p. 308-313, Jan 1 1996.

DRATWA, M.; WYSOCZAŃSKA, B.; BUTRYM, A.; ŁACINA, P. *et al.* TERT genetic variability and telomere length as factors affecting survival and risk in acute myeloid leukaemia. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 23301, 2021/12/02 2021.

EL BELBESY, S. F.; EL AGGAN, H. A.; SULTAN, H. K.; EL NAGGAR, A. A. *et al.* Telomere length and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) level in patients with acute myeloid leukemia: Impact on clinical outcome. **Acta Haematologica Polonica**, 46, n. 4, p. 304-311, 2015/09/01/ 2015.

FERETZAKI, M.; RENCK NUNES, P.; LINGNER, J. Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. **Rna**, 25, n. 11, p. 1470-1480, Nov 2019.

FEUERHAHN, S.; IGLESIAS, N.; PANZA, A.; PORRO, A. *et al.* TERRA biogenesis, turnover and implications for function. **FEBS Lett**, 584, n. 17, p. 3812-3818, Sep 10 2010.

GARCIA-MUSE, T.; AGUILERA, A. R Loops: From Physiological to Pathological Roles. **Cell**, 179, n. 3, p. 604-618, Oct 17 2019.

GHANIM, G. E.; FOUNTAIN, A. J.; VAN ROON, A.-M. M.; RANGAN, R. *et al.* Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. **Nature**, 593, n. 7859, p. 449-453, 2021/05/01 2021.

GONATOPOULOS-POURNATZIS, T.; COWLING, V. H. Cap-binding complex (CBC). **Biochem J**, 457, n. 2, p. 231-242, Jan 15 2014.

GRAF, M.; BONETTI, D.; LOCKHART, A.; SERHAL, K. *et al.* Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. **Cell**, 170, n. 1, p. 72-85.e14, Jun 29 2017.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F.; SANTANA-LEMOS, B. A.; SCHEUCHER, P. S.; ALVES-PAIVA, R. M. *et al.* Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. **PLoS One**, 9, n. 11, p. e113747, 2014.

HARTMANN, U.; BRÜMMENDORF, T. H.; BALABANOV, S.; THIEDE, C. *et al.* Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities. **Haematologica**, 90, n. 3, p. 307-316, Mar 2005.

JONES, S. E.; FLEUREN, E. D. G.; FRANKUM, J.; KONDE, A. *et al.* ATR Is a Therapeutic Target in Synovial Sarcoma. **Cancer Res**, 77, n. 24, p. 7014-7026, Dec 15 2017.

KARLSEDER, J.; SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. **Science**, 295, n. 5564, p. 2446-2449, Mar 29 2002.

KASZUBOWSKA, L. Telomere shortening and ageing of the immune system. **J Physiol Pharmacol**, 59 Suppl 9, p. 169-186, Dec 2008.

KLAPPER, W.; QIAN, W.; SCHULTE, C.; PARWARESCH, R. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. **Leukemia**, 17, n. 10, p. 2007-2015, Oct 2003.

KOSIOL, N.; JURANEK, S.; BROSSART, P.; HEINE, A. *et al.* G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy. **Mol Cancer**, 20, n. 1, p. 40, Feb 25 2021.

KROEGER, H.; JELINEK, J.; ESTÉCIO, M. R. H.; HE, R. *et al.* Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. **Blood**, 112, n. 4, p. 1366-1373, 2008.

KROUPA, M.; TOMASOVA, K.; KAVEC, M.; SKROBANEK, P. *et al.* Telomeric repeat-containing RNA (TERRA): Physiological functions and relevance in cancer. **Front Oncol**, 12, p. 913314, 2022.

LANSDORP, P. M. Telomeres, stem cells, and hematology. **Blood**, 111, n. 4, p. 1759-1766, 2008.

LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 17, n. 6, p. 364-378, Jun 2016.

LEE, D. D.; LEÃO, R.; KOMOSA, M.; GALLO, M. *et al.* DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. **J Clin Invest**, 129, n. 1, p. 223-229, Jan 2 2019.

LIM, C. J.; CECH, T. R. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 22, n. 4, p. 283-298, Apr 2021.

LINDSLEY, R. C.; MAR, B. G.; MAZZOLA, E.; GRAUMAN, P. V. *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. **Blood**, 125, n. 9, p. 1367-1376, 2015.

LOCKHART, A.; PIRES, V. B.; BENTO, F.; KELLNER, V. *et al.* RNase H1 and H2 Are Differentially Regulated to Process RNA-DNA Hybrids. **Cell Reports**, 29, n. 9, p. 2890-2900.e2895, 2019/11/26/ 2019.

LOVEJOY, C. A.; LI, W.; REISENWEBER, S.; THONGTHIP, S. *et al.* Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. **PLoS Genet**, 8, n. 7, p. e1002772, 2012.

LUKE, B.; PANZA, A.; REDON, S.; IGLESIAS, N. *et al.* The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell**, 32, n. 4, p. 465-477, Nov 21 2008.

MACIEJOWSKI, J.; DE LANGE, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 18, n. 3, p. 175-186, Mar 2017.

MATHON, N. F.; LLOYD, A. C. Cell senescence and cancer. **Nature Reviews Cancer**, 1, n. 3, p. 203-213, 2001/12/01 2001.

MEI, Y.; DENG, Z.; VLADIMIROVA, O.; GULVE, N. *et al.* TERRA G-quadruplex RNA interaction with TRF2 GAR domain is required for telomere integrity. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 3509, Feb 10 2021.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Res**, 43, n. W1, p. W566-570, Jul 1 2015.

MISINO, S.; BONETTI, D.; LUKE-GLASER, S.; LUKE, B. Increased TERRA levels and RNase H sensitivity are conserved hallmarks of post-senescent survivors in budding yeast. **Differentiation**, 100, p. 37-45, Mar - Apr 2018.

MORAVEC, M.; WISCHNEWSKI, H.; BAH, A.; HU, Y. *et al.* TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO reports**, 17, n. 7, p. 999-1012, 2016.

MORITA, K.; WANG, F.; JAHN, K.; HU, T. *et al.* Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 5327, Oct 21 2020.

NERGADZE, S. G.; FARNUNG, B. O.; WISCHNEWSKI, H.; KHORIAULI, L. *et al.* CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **Rna**, 15, n. 12, p. 2186-2194, Dec 2009.

NIETO-SOLER, M.; MORGADO-PALACIN, I.; LAFARGA, V.; LECONA, E. *et al.* Efficacy of ATR inhibitors as single agents in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, 7, n. 37, p. 58759-58767, Sep 13 2016.

OLOVNIKOV, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **J Theor Biol**, 41, n. 1, p. 181-190, Sep 14 1973.

ONECHA, E.; RAPADO, I.; LUZ MORALES, M.; CARRENO-TARRAGONA, G. *et al.* Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. **Haematologica**, 106, n. 9, p. 2325-2333, Sep 1 2021.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annu Rev Genet**, 42, p. 301-334, 2008.

PAPAEMMANUIL, E.; GERSTUNG, M.; BULLINGER, L.; GAIDZIK, V. I. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, 374, n. 23, p. 2209-2221, 2016.

PORRO, A.; FEUERHAHN, S.; DELAFONTAINE, J.; RIETHMAN, H. *et al.* Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. **Nature Communications**, 5, n. 1, p. 5379, 2014/10/31 2014.

RAMAMOORTHY, M.; SMITH, S. Loss of ATRX Suppresses Resolution of Telomere Cohesion to Control Recombination in ALT Cancer Cells. **Cancer Cell**, 28, n. 3, p. 357-369, Sep 14 2015.

REDON, S.; REICHENBACH, P.; LINGNER, J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. **Nucleic Acids Research**, 38, n. 17, p. 5797-5806, 2010.

REGO, E. M.; JACOMO, R. H. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin america. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, 3, n. 1, p. e2011049, 2011.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, 17, n. 5, p. 405-424, May 2015.

RIPPE, K.; LUKE, B. TERRA and the state of the telomere. **Nat Struct Mol Biol**, 22, n. 11, p. 853-858, Nov 2015.

ROAKE, C. M.; ARTANDI, S. E. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 21, n. 7, p. 384-397, 2020/07/01 2020.

SAGIE, S.; TOUBIANA, S.; HARTONO, S. R.; KATZIR, H. *et al.* Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids. **Nature Communications**, 8, n. 1, p. 14015, 2017/01/24 2017.

SASAKI, K.; RAVANDI, F.; KADIA, T. M.; DINARDO, C. D. *et al.* De novo acute myeloid leukemia: A population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017. **Cancer**, 127, n. 12, p. 2049-2061, Jun 15 2021.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, 9, n. 7, p. 676-682, Jun 28 2012.

SCHMITT, C. A.; WANG, B.; DEMARIA, M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 19, n. 10, p. 619-636, 2022/10/01 2022.

SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. **Nature Cell Biology**, 10, n. 2, p. 228-236, 2008/02/01 2008.

SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. **Nat Cell Biol**, 10, n. 2, p. 228-236, Feb 2008.

SHALLIS, R. M.; WANG, R.; DAVIDOFF, A.; MA, X. *et al.* Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. **Blood Rev**, 36, p. 70-87, Jul 2019.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1, n. 1, p. 72-76, Oct 2000.

TENG, Y. C.; SUNDARESAN, A.; O'HARA, R.; GANT, V. U. *et al.* ATRX promotes heterochromatin formation to protect cells from G-quadruplex DNA-mediated stress. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 3887, Jun 23 2021.

TOUBIANA, S.; GAGLIARDI, M.; PAPA, M.; MANCO, R. *et al.* Persistent epigenetic memory impedes rescue of the telomeric phenotype in human ICF iPSCs following DNMT3B correction. **eLife**, 8, p. e47859, 2019/11/18 2019.

TOUBIANA, S.; SELIG, S. DNA:RNA hybrids at telomeres – when it is better to be out of the (R) loop. **The FEBS Journal**, 285, n. 14, p. 2552-2566, 2018.

TOUBIANA, S.; SELIG, S. Human subtelomeric DNA methylation: regulation and roles in telomere function. **Current Opinion in Genetics & Development**, 60, p. 9-16, 2020/02/01/2020.

TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood**, 124, n. 18, p. 2775-2783, Oct 30 2014.

VON MORGEN, P.; MACIEJOWSKI, J. The ins and outs of telomere crisis in cancer. **Genome Medicine**, 10, n. 1, p. 89, 2018/11/27 2018.

VOSBERG, S.; GREIF, P. A. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. **Genes Chromosomes Cancer**, 58, n. 12, p. 839-849, Dec 2019.

WANG, I. X.; GRUNSEICH, C.; FOX, J.; BURDICK, J. *et al.* Human proteins that interact with RNA/DNA hybrids. **Genome Res**, 28, n. 9, p. 1405-1414, Sep 2018.

WANG, L.; XIAO, H.; ZHANG, X.; WANG, C. *et al.* The role of telomeres and telomerase in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. **J Hematol Oncol**, 7, p. 61, Aug 20 2014.

WATTS, J. M.; DUMITRIU, B.; HILDEN, P.; KISHTAGARI, A. *et al.* Telomere length and associations with somatic mutations and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, 49, p. 62-65, Oct 2016.

WELLS, J. P.; WHITE, J.; STIRLING, P. C. R Loops and Their Composite Cancer Connections. **Trends Cancer**, 5, n. 10, p. 619-631, Oct 2019.

YAMAGUCHI, H.; CALADO, R. T.; LY, H.; KAJIGAYA, S. *et al.* Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. **N Engl J Med**, 352, n. 14, p. 1413-1424, Apr 7 2005.

ZHANG, W.; PIATYSZEK, M. A.; KOBAYASHI, T.; ESTEY, E. *et al.* Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. **Clin Cancer Res**, 2, n. 5, p. 799-803, May 1996.

ZANELATTO, Leonardo Campos. Expressão do RNA telomérico não-codificante TERRA em leucemias agudas e telomeropatias. 2019. Tese (Doutorado em Células Tronco e Terapia

Celular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. doi:10.11606/T.17.2019.tde-06092019-144820. Acesso em: 2022-10-30.