

**GABRIEL ARANTES GALVÃO DIAS DOS SANTOS**

**Avaliação da expressão dos principais complexos de manutenção  
telomérica na progressão do câncer de próstata**

**São Paulo**

**2023**

**GABRIEL ARANTES GALVÃO DIAS DOS SANTOS**

**Avaliação da expressão dos principais complexos de manutenção  
telomérica na progressão do câncer de próstata**

**Versão Original**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Miguel Srougi

**São Paulo**

**2023**

/

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dos Santos, Gabriel Arantes Galvão Dias  
Avaliação da expressão dos principais complexos  
de manutenção telomérica na progressão do câncer de  
próstata / Gabriel Arantes Galvão Dias Dos Santos. --  
São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Urologia.  
Orientador: Miguel Srougi.

Descritores: 1. Neoplasias da próstata 2. Telômero  
3. Prognóstico 4. Expressão gênica

USP/FM/DBD-110/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **Dedicatória**

À Universidade de São Paulo e a todos seus professores e funcionários pela imensurável contribuição na minha formação.

A qualidade e excelência desta instituição é motivo de orgulho e esperança em um futuro melhor.

Agradeço a honra de ter feito parte da mesma universidade dos principais cientistas e pensadores brasileiros.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Miguel Srougi, meu orientador, que além de ser meu mentor sempre me apoiou e me proporcionou a melhor experiência possível durante o doutorado. O senhor é fonte de inspiração e um exemplo profissional e pessoal a ser seguido.

Às Professoras Dra. Kátia Leite e Dra. Sabrina Reis, que lideram o LIM-55 com excelência, servindo como exemplo de dedicação e qualidade profissional. Obrigado por todos os conselhos e conversas, profissionais e pessoais, durante a minha formação. Sou eternamente grato por ter tido o privilégio de trabalhar com ambas.

Ao Professor Dr. William Nahas, professor titular de nosso departamento. Agradeço por estar à frente da urologia da FMUSP e proporcionar um ambiente de desenvolvimento científico e profissional.

A Elisa Cruz e a todos os funcionários da disciplina de Urologia que fornecem todo o apoio institucional em nossa pós-graduação. Obrigado pela disponibilidade e gentileza em sempre me auxiliarem durante o doutorado.

Ao Iran Amorim Silva por auxiliar todos os alunos do LIM-55, sempre estando disponível em nossos experimentos e nas questões técnicas do laboratório. Seu profissionalismo é essencial para o andamento de todos os projetos científicos que passam pelo nosso laboratório.

A todos os colegas e amigos do LIM-55, que afirmo, sem demagogia nenhuma, foram essenciais para o desenvolvimento desta tese. Nayara Izabel Viana, Juliana de Camargo, Ruan Pimenta, Vanessa Shereiter, Denis Reis, Fábio Galucci, Gustavo Inoue, Poliana Romão, Patrícia Cândido, Victória Ghazarian, Daniel Ayres, Vinicius dos Santos e a todos os alunos que passaram pelo LIM-55. Agradeço imensamente pelo companheirismo e profissionalismo durante esses anos.

Ao professor Dr. João Pedro de Magalhães que me recebeu em seu laboratório na Universidade de Birmingham. Obrigado pelos ensinamentos e por me orientar durante 1 ano em seu grupo de pesquisa. Estendo meus agradecimentos aos meus colegas de laboratório durante o ano de 2021.

Agradeço a todos da minha família, em especial minha mãe, Ruth Arantes Galvão, e minha avó, Nadua Abrahão Galvão, pelo apoio e amor incondicional. Obrigado por sempre acreditarem em mim.

A minha companheira, Betina Gimenez Madueño Silva, por ser meu porto seguro. Obrigado pelo amor, amizade e companheirismo. Discutir meu trabalho e ouvir seus conselhos foram fundamentais para a confecção desta tese. Você é essencial na minha vida.

A CAPES por me financiar durante o doutorado o que me permitiu me dedicar integralmente ao meu projeto de pesquisa e confecção desta tese.

Aos pacientes, que permanecem anônimos, cujas amostras eu utilizei durante meu trabalho. Esse estudo não seria possível sem essa nobre doação em prol da ciência.

A todos os cientistas e pesquisadores que vieram antes de mim, e me inspiraram a realizar este trabalho. O avanço da ciência é um esforço conjunto e espero um dia que esta tese possa contribuir na formação de novos profissionais.

Aos contribuintes do Estado de São Paulo e do Brasil por financiarem a existência de uma universidade pública de qualidade. Espero que de alguma maneira eu consiga retornar o investimento em mim feito para a sociedade.

Essa dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo .....	1
Abstract.....	3
1. Introdução.....	5
1.1 Aspectos gerais do câncer.....	6
1.2 Câncer de próstata.....	7
1.2.1 Aspectos gerais.....	7
1.2.2 Biologia Molecular .....	10
1.3 Características gerais dos telômeros.....	12
1.4 Telômeros e câncer.....	17
1.4.1 Características gerais:.....	17
1.4.2 Shelterin e câncer: .....	21
1.4.3 CST e câncer .....	22
1.4.4 TERRA e câncer .....	22
1.5 Telômeros e câncer de próstata.....	23
1.6 Justificativa .....	26
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo Primário .....	28
2.2 Objetivos Secundários .....	28
3. Métodos .....	29
3.1 Tipo de estudo.....	30
3.2 Época e local.....	30
3.3 Casuística .....	30
3.3.1 Análises de bioinformática.....	30



3.3.2 Amostras de Pacientes .....	31
3.3.3 Linhagens Celulares.....	32
3.4 Métodos .....	32
3.4.1 Extração do RNA total .....	32
3.4.2 Transcrição reversa (RT) .....	33
3.4.3 Análises de expressão de gênica por PCR em tempo real quantitativo .....	34
3.4.4 Determinação do tamanho do telômero por PCR em tempo real quantitativa .....	35
3.4.5 Delineamento Experimental .....	37
3.6 Desfechos.....	37
3.7 Análise estatística .....	38
3.8 Financiamento.....	39
4. Resultados.....	40
4.1 Complexo Shelterin .....	41
4.1.1 POT1 .....	41
4.1.2 TRF1.....	43
4.1.3 TRF2.....	45
4.1.4 TPP1.....	47
4.1.5 TIN2.....	49
4.1.6 RAPI.....	51
4.2 Telomerase.....	53
4.2.1 TERT .....	53
4.2.2 TERC.....	55
4.3 Complexo CST .....	57
4.3.1 CTC1 .....	57
4.3.2 STN1 .....	59
4.3.3 TEN1.....	60

4.4 TERRA .....	62
4.5 Tamanho do Telômero .....	63
5. Discussão .....	67
5.1 Complexo Shelterin .....	68
5.1.1 <i>POT1</i> .....	68
5.1.2 <i>TRF1</i> .....	69
5.1.3 <i>TRF2</i> .....	71
5.1.4 <i>TPP1</i> .....	73
5.1.5 <i>TIN2</i> .....	74
5.2.6 <i>RAP1</i> .....	75
4.2 Telomerase .....	76
5.2.1 <i>TERT</i> .....	76
5.2.2 <i>TERC</i> .....	79
4.4 Complexo CST .....	81
5.3.1 <i>CTCI</i> .....	81
5.3.2 <i>STN1</i> .....	83
5.3.3 <i>TEN1</i> .....	84
5.4 TERRA .....	84
5.5 Tamanho do Telômero .....	86
5.6 Considerações finais .....	90
6. Conclusão .....	92
Referências .....	94

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Características fundamentais para o surgimento e manutenção do câncer. ....	7
<b>Figura 2.</b> Graduação proposta pela ISUP para o CP e as curvas de sobrevida livre de recidiva de acordo com esta classificação .....	9
<b>Figura 3.</b> Sinalização do andrógeno e RA nas células da próstata. ....	11
<b>Figura 4.</b> Estrutura básica do DNA telomérico humano .....	13
<b>Figura 5.</b> Conformações alternativas do telômero.....	13
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da reação de adição de DNA telomérico pela telomerase.....	14
<b>Figura 7.</b> Associação entre o complexo shelterin e CST no DNA telomérico .....	16
<b>Figura 8.</b> A ação orquestrada dos complexos shelterin e CST na regulação da replicação do DNA telomérico .....	17
<b>Figura 9.</b> Esquema que representa o encurtamento telomérico progressivo durante sucessivas divisões celulares .....	19
<b>Figura 10.</b> Esquema básico de como o encurtamento telomérico pode gerar a instabilidade genômica. ....	20
<b>Figura 11.</b> Modelo teórico que ilustra o papel dos telômeros na progressão do câncer de próstata .....	25
<b>Figura 12.</b> Delineamento experimental esquematizado .....	37
<b>Figura 13.</b> Envolvimento de POT1 no câncer de próstata.....	42
<b>Figura 14.</b> Envolvimento de TRF1 no câncer de próstata.....	44
<b>Figura 15.</b> Envolvimento de TRF2 no câncer de próstata.....	46
<b>Figura 16.</b> Envolvimento de TPP1 no câncer de próstata. ....	48
<b>Figura 17.</b> Envolvimento de TIN2 no câncer de próstata.....	50
<b>Figura 18.</b> Envolvimento de RAP1 no câncer de próstata .....	52
<b>Figura 19.</b> Envolvimento de TERT no câncer de próstata. ....	54
<b>Figura 20.</b> Envolvimento de TERC no câncer de próstata. ....	56
<b>Figura 21.</b> Envolvimento de CTC1 no câncer de próstata .....	58
<b>Figura 22.</b> Envolvimento de STN1 no câncer de próstata.....	60
<b>Figura 23.</b> Envolvimento de TEN1 no câncer de próstata .....	61
<b>Figura 24.</b> Envolvimento de TERRA no câncer de próstata. ....	63
<b>Figura 25.</b> Envolvimento do tamanho dos telômeros no câncer de próstata.. ....	65

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Características dos pacientes .....	31
<b>Tabela 2.</b> Sondas e iniciadores utilizados no trabalho.....	35
<b>Tabela 3.</b> Resumo dos resultados .....	66

## **Lista de abreviaturas**

ALT = Mecanismo de manutenção telomérica alternativo

cDNA = DNA complementar

CNV = Variação no número de cópias

CP = Câncer de Próstata

CPRC = Câncer de Próstata Resistente à Castração

CTC1 = Componente 1 do complexo CST de replicação telomérica

DHT = Di-hidrotestosterona

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DNTPs = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DU145 = Linhagem celular derivada de sítio cerebral de câncer de próstata

FMUSP = Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HPB = Hiperplasia Benigna da Próstata

ISUP= Sociedade Internacional de Urologia

LNCaP = Linhagem celular derivada de sítio linfonodal de câncer de próstata

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PC3= Linhagem celular derivada de sítio ósseo de câncer de próstata

MicroRNA = pequenos RNAs não codificantes

PNT2 = Linhagem celular derivada de epitélio prostático normal

POT1 = Proteção dos telômeros 1

PSA = Antígeno prostático específico

RA = Receptor de Andrógeno

RAP1 = Proteína repressora/ativadora 1

RNA = Ácido ribonucleico

ROS = Espécies reativas de oxigênio

TCGA = O atlas genômico do câncer

TEN1 = Componente TEN1 do complexo CST

TIN2 = Proteína interatora de TRF1 2

TERC = Componente RNA da telomerase

TERRA = Repetições teloméricas que contém RNA

TERT = Transcriptase reversa da telomerase

TPP1 = Proteína interatora de POT1 e TIN2 1

TRF1 = Fator de ligação à repetição telomérica 1

TRF2 = Fator de ligação à repetição telomérica

## RESUMO

Dos Santos GAGD. Avaliação da expressão dos principais complexos de manutenção telomérica na progressão do câncer de próstata [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023

**Introdução:** O câncer de próstata (CP) é a neoplasia mais diagnosticada em homens e a causa de milhares de mortes em todo o mundo. A maioria dos óbitos causados pelo CP ocorre quando a doença evolui para o fenótipo metastático. Por este motivo, estimulam-se estudos sobre a progressão do CP, visando encontrar novos alvos para biomarcadores. Um desses alvos podem ser os telômeros. Os telômeros são as extremidades físicas dos cromossomos eucariotos, fundamentais para a estabilidade genômica e para o controle do número de divisões celulares. O bom funcionamento do telômero é garantido por diversos complexos moleculares, principalmente: os complexos shelterin, CST, telomerase e TERRA. Sucessivos estudos demonstraram que a disfunção do telômero e a expressão aberrante de componentes da maquinaria telomérica, ocorrem na maioria das neoplasias, estando diretamente relacionado com a iniciação e progressão do CP. Apesar da importância, pouco se sabe sobre a expressão dos componentes dos complexos que regulam o telômeros e sobre sua relação com a progressão do CP. **Objetivo:** Avaliar o papel dos componentes dos complexos shelterin (POT1, TRF1, TRF2, TPP1, TIN2 e RAP1), CST (CTC1, STN1 e TEN1), telomerase (TERT e TERC), TERRA e tamanho telomérico tumoral na progressão do câncer de próstata. **Métodos:** As análises foram feitas da seguinte maneira: 1- Avaliamos alterações genéticas dos componentes do complexo shelterin, CST e telomerase a partir de análises de bioinformática em amostras de CP localizado (n=499) e câncer de próstata metastático resistente à castração (CPRC) (n=444). 2- Analisamos a expressão gênica das subunidades dos complexos de manutenção telomérica utilizando abordagens de bioinformática (CP localizado, n= 497 e controle n= 152) e experimentais, com espécimes cirúrgicas (CP localizado n = 81 e HPB n = 10) e linhagens celulares de CP metastático (LNCaP, DU145, PC3 e PNT2 como controle) por PCR em tempo real. As análises da expressão do TERRA foram feitas somente por abordagens experimentais. 3- Determinamos o tamanho do telômero nas mesmas amostras experimentais citadas anteriormente por PCR em tempo real. Todos os dados coletados foram relacionados com fatores clínicos da doença (PSA, volume

tumoral, ISUP, estadiamento patológico, risco do câncer, recidiva bioquímica e curvas de sobrevida). **Resultados:** As mutações dos genes estudados são pouco comuns e sem relevância clara no prognóstico. As CNVs também são pouco comuns, com exceção de TRF1 e RAP1 (6 e 8% de alterações respectivamente). Apesar disso, observamos um aumento significativo na proporção de ampliações em POT1, TRF1, TIN2, TERT, TERC e TEN1 no CPCR. Na coorte de bioinformática temos que TRF1, TPP1 e CTC1 estão significativamente subexpressos e TEN1 significativamente superexpresso. Na coorte clínica, temos que TRF1, CTC1 e TERRA estão significativamente subexpressos e TRF2, TIN2, RAP1, TERT, TERC e TEN1 significativamente superexpressos. No câncer localizado, a superexpressão de POT1, TRF1, TPP1, TIN2, RAP1, TERT, CTC1, STN1 e TEN1 se associa ao pior prognóstico. A subexpressão de TERRA se associa ao pior prognóstico. A expressão de TRF2 e TERC se classificam como contexto dependente. Nas linhagens celulares metastáticas, POT1, TRF2 e TERT estão superexpressos no CPCR e TRF1, TIN2, RAP1, TERC e TERRA subexpressos. STN1 e TEN1 se encontram superexpressos em todas as linhagens de CP. CTC1 se classifica como contexto dependente. Os telômeros são curtos na HPB e no CP, porém significativamente maiores no câncer. O aumento relativo do tamanho telomérico se associa com tumores mais agressivos. **Conclusão:** Alterações na expressão gênica dos componentes que mantêm a homeostase do telômero associam-se com a progressão do CP. Essas variações criam um ambiente que favorece o aumento relativo do tamanho do telômero, permitindo o aparecimento de características desfavoráveis nos tumores. A desregulação da biologia dos telômeros participa da progressão do CP, onde genes específicos tem potencial para se tornarem biomarcadores na doença.

**Palavras-chave:** Neoplasias da próstata. Telômero. Prognóstico. Expressão gênica.



## ABSTRACT

Dos Santos GAGD. Evaluating the expression of the main telomeric complexes in the prostate cancer progression [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**Introduction:** Prostate cancer (PC) is the most common neoplasia in men and causes thousands of deaths worldwide when it progresses to the metastatic stage. The search for biological mechanisms related to PC progression is urgent, aiming to find new diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets. Telomeres might be one of these targets. The telomeres are the structural ends of the eukaryote chromosomes, essential for the genome stability and control of the maximum number of cell divisions. Telomere homeostasis depends on several complexes, being the four main complexes the shelterin complex, CST complex, telomerase, and TERRA. Telomeric dysfunction and abnormal expression of telomeric components are reported in most cancers and have been related to the initiation and progression of PC. Despite the importance of these mechanisms, there are few studies about the expression of the main telomere complexes and their relationship with PC progression. **Objective:** To evaluate the role of each molecule of shelterin (POT1, TRF1, TRF2, TPP1, TIN2, and RAP1), CST (CTC1, STN1, and TEN1), telomerase (TERT and TERC), TERRA and telomere length in the progression of prostate cancer. **Methods:** The analyzes were carried out as follows: 1- We evaluated genetic alterations of the components of the shelterin, CST, and telomerase by bioinformatics analyses in samples of localized PC (n = 499) and castration-resistant metastatic prostate cancer (CRPC) (n = 444). 2- We analyzed the gene expression of the subunits of telomeric maintenance complexes using bioinformatics (localized PC n = 497 and control n = 152) and experimental approaches, with surgical specimens (localized CP n = 81 and HPB n = 10) and metastatic PC cell lines (LNCaP, DU145, PC3 and PNT2 as control) by real-time PCR. Analyzes of TERRA expression were made only by experimental approaches. 3- Real-time PCR determined the telomere length in the same experimental samples. All acquired data were associated with clinical factors (PSA, tumor volume, ISUP, cancer stage, cancer risk, biochemical recurrence, and survival curves). **Results:** Mutations in studied genes are uncommon and do not have an association with prognosis. CNVs are also uncommon, except for TRF1 and RAP1 (6 and 8% of alterations, respectively). Despite this, we observed a significant increase in the proportion of amplifications in POT1, TRF1, TIN2, TERT, TERC, and TEN1 in CRPC. In the bioinformatics cohort, we

find that TRF1, TPP1, and CTC1 were downregulated and TEN1 upregulated. In the clinical cohort, we found that TRF1, CTC1, and TERRA were downregulated, and TRF2, TIN2, RAP1, TERT, TERC, and TEN1 were upregulated. In localized cancer, overexpression of POT1, TRF1, TPP1, TIN2, RAP1, TERT, CTC1, STN1 and TEN1 were associated with poor-prognosis. The underexpression of TERRA was associated with poor prognosis. The expression of TRF2 and TERC are dependent on the context. In the metastatic cell lines, POT1, TRF2, and TERT were upregulated in the CRPC, and TRF1, TIN2, RAP1, TERC, and TERRA were downregulated. STN1 and TEN1 were overexpressed in all PC lines. CTC1 is classified as context-dependent. Telomeres are short on BPH and PC but longer in cancer. The relative increase in telomere length was associated with more aggressive tumors. **Conclusion:** Differential gene expression in telomeric components are associated with PC progression. These variations create an environment that favors the relative increase in telomere length, allowing the appearance of unfavorable characteristics in tumors. The dysfunction in telomere biology has a role in the PC progression, in which specific genes can potentially become biomarkers in the disease.

**Keywords:** Prostatic neoplasms. Telomere. Prognosis. Gene expression.

# 1. Introdução

## 1.1 Aspectos gerais do câncer

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela proliferação anormal de células, fazendo com que ocorra a invasão de tecidos e órgãos, podendo se espalhar por todo o organismo (1). Do ponto de vista epidemiológico, surgem aproximadamente 14 milhões de novos casos da doença por ano, com mais de 8 milhões de mortes espalhadas pelo mundo (2).

O câncer é uma doença causada por acúmulo de mutações genéticas, que alteram vias moleculares responsáveis pela proliferação celular, apoptose, maquinaria de reparo ao DNA, diferenciação celular, entre outras alterações bioquímicas. Tais alterações conferem vantagens competitivas das células tumorais em relação às células saudáveis, exatamente por permitir que elas consigam ignorar certos filtros celulares (como os *checkpoints* do ciclo celular) e continuem se dividindo indefinidamente. Apesar de ser uma doença heterogênea, possuem como característica em comum a capacidade de proliferação indefinida e desordenada, além da imortalização celular que resulta no rompimento da homeostasia tecidual e gera sérios danos ao organismo como um todo (1, 3, 4, 5).

O câncer é considerado uma doença de origem multifatorial, ou seja, é causada pela interação entre causas genéticas e ambientais. Os fatores genéticos correspondem em mutações somáticas, hereditárias e alterações epigenéticas. Entre os fatores ambientais podemos ressaltar o tabagismo, etilismo, certos hábitos alimentares e sexuais, fatores ocupacionais, uso de certos medicamentos, entre outros. Além disso, certas infecções virais podem influenciar o aparecimento da doença (6).

Apesar do aparecimento do câncer ter causas diversas, existem alguns eventos moleculares chaves para a iniciação e progressão da doença, incluem-se aqui: a capacidade de resistir à morte celular, a desregulação do metabolismo celular, a manutenção de sinais de proliferação, a evasão de supressores tumorais, a evasão do sistema imune, a imortalização celular, a promoção de sinais pró-inflamatórios, a ativação de invasão e metástase, a indução ou acesso vascular e a instabilidade genômica. Além desses eventos, pesquisadores enaltecem as células senescentes em conjunto com o desbloqueio da plasticidade fenotípica (*Emerging Hallmarks*) em sincronia com a reprogramação epigenética independente de mutações e um microbioma polimórfico (*Enabling Characteristics*) como outros eventos importantíssimos. Aqui vale ressaltar a

imortalização celular, que está diretamente relacionada com os telômeros e será discutida com detalhes no presente estudo (3). A figura 1 ilustra esses eventos de forma resumida.



**Figura 1.** Características fundamentais para o surgimento e manutenção do câncer. Figura adaptada de (1)

## 1.2 Câncer de próstata.

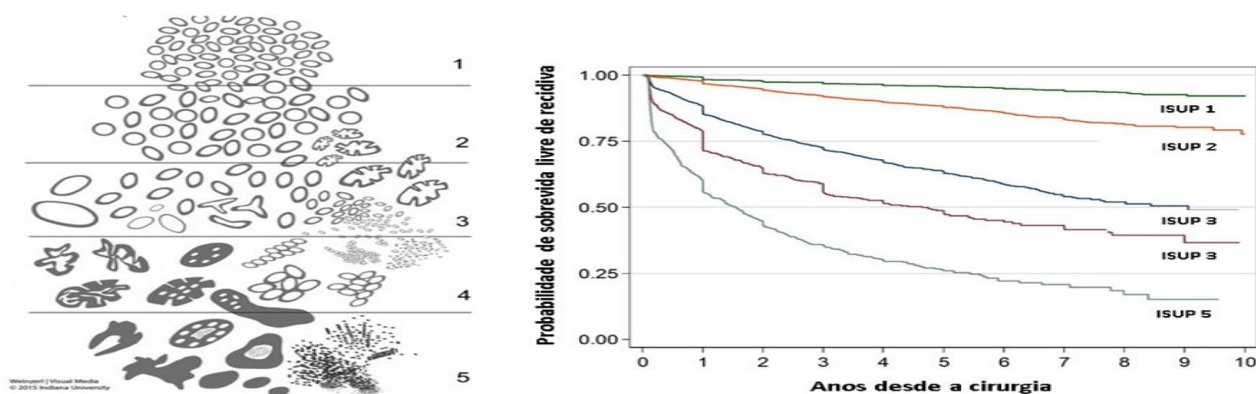
### 1.2.1 Aspectos gerais

Mundialmente, o câncer de próstata (CP) é o tipo de câncer mais diagnosticado em homens (7). No ano de 2020, mais de 190 mil novos casos com mais de 33 mil mortes foram previstos nos EUA (8). No Brasil, dados do INCA apontam para 65.840 novos casos de CP a cada ano, no biênio 2020-2022, com 15.576 mortes (9). Estima-se que um em cada oito homens serão diagnosticados com essa doença em algum momento de sua vida e 2,5% morrerão em decorrência dela (10). Apesar da sobrevivência para esse câncer, quando localizado, seja próxima de 100% em 5 anos, essa taxa cai para 30,2% quando há presença de metástase (11).

Existem diversos fatores de riscos relacionados ao CP, dentre eles podemos destacar fatores hereditários, raciais, ambientais, alimentares e a idade. A incidência da doença tem aumento significativo após os 50 anos e estima-se que indivíduos que possuem parentes em primeiro grau com histórico da doença, tem o dobro de risco do aparecimento da neoplasia quando comparados com o resto da população (12).

Estudos com gêmeos mostram que a hereditariedade é mais importante no CP que em outras neoplasias (13). Uma compilação de diversos estudos de *Genome Wide Association* reporta 76 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) associados com risco aumentado de CP (14). Além disso, indivíduos de etnia negra têm de 2 a 3 vezes mais chances de adquirirem a doença e apresentam uma mortalidade 30% superior (15).

O CP é classificado principalmente de acordo com o escore de Gleason, que é baseado no padrão histológico, arranjo das células e grau de diferenciação celular. Essa classificação inclui cinco graus histológicos, onde o 1º representa a lesão mais diferenciada e o 5º a mais indiferenciada. Obtém-se um escore a partir da soma entre o padrão mais comum e o segundo padrão mais comum da lesão. Em consenso a ISUP (*International Society of Urological Pathology*) recomendou a utilização de uma nova forma de graduação que utiliza os graus de Gleason, mas os classifica em cinco classes de acordo com o risco da doença (16, 17, 18). A figura 2 a seguir representa os cinco graus histológicos do escore de Gleason para o CP e a classificação ISUP.



Gleason	ISUP
3+3	1
3+4	2
4+3	3
4+4, 3+5, 5+3	4
4+5, 5+4, 5+5	5

**Figura 2.** Graduação proposta pela ISUP para o CP e as curvas de sobrevivida livre de recidiva de acordo com esta classificação

A avaliação clínica de pacientes com suspeita de CP é feita a partir do toque retal e da concentração do PSA (antígeno prostático específico) sérico. O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células prostáticas com função associada à liquefação do coágulo seminal para permitir a liberação dos espermatozoides (19). Doenças na próstata normalmente aumentam a produção do PSA bem como seu acesso à circulação, o que faz desta aferição o exame mais utilizado no rastreamento do CP (20, 21). É importante ressaltar que embora o PSA seja importante para o rastreamento do câncer, o valor prognóstico dos níveis séricos do PSA é questionável e tem sido associado a uma alta taxa de diagnóstico/tratamento excessivos em ensaios clínicos (22, 23, 24).

O diagnóstico final do CP se dá a partir da biópsia, onde 90% dos tumores são adenocarcinomas e os outros 10% são divididos basicamente entre tumores mesenquimais ou uroteliais (25).

O CP é considerado uma doença extremamente heterogênea e suas formas mais agressivas podem gerar metástases em diferentes tecidos. As metástases mais comuns ocorrem no tecido ósseo e nos linfonodos. Outros locais menos comuns incluem a bexiga, fígado, glândulas adrenais, sistema nervoso central e pulmão (essa última normalmente assintomática) (26, 27).

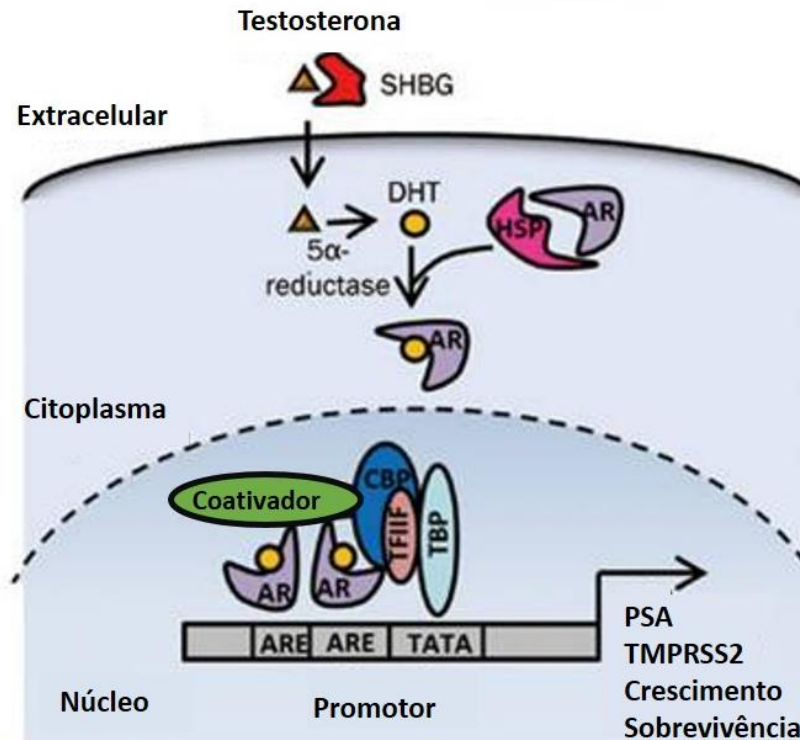
O tratamento definitivo para a doença localizada é a prostatectomia radical ou a radioterapia. Entretanto, para doença avançada ou metastática as terapias comuns incluem quimioterapia e o bloqueio androgênico (28).

É importante destacar que danos causados pelo tratamento e diagnóstico excessivos é um problema real no CP. Portanto, ser capaz de prever quais pacientes precisam de um tratamento radical, por ter um câncer agressivo, e quais pacientes teriam uma doença indolente é fundamental (29). Devido à grande heterogeneidade do câncer de próstata, fatores prognósticos clássicos, como PSA sérico e escore de Gleason, não são suficientemente precisos para separar tumores indolentes e agressivos de forma totalmente confiável (30). Além disso, pela sua heterogeneidade, a classificação molecular do CP não é precisa o suficiente, com mais de 25% dos tumores sem classificação (31). Nesse sentido, biomarcadores genéticos podem ser ferramentas importantes tanto para o entendimento da patogênese do tumor quanto para melhorar o manejo clínico do CP.

### *1.2.2 Biologia Molecular*

Entre os aspectos moleculares do câncer de próstata podemos destacar o envolvimento dos receptores de andrógenos (RA ou AR, do inglês *androgen receptor*). O RA é um fator de transcrição que se associa com cofatores para transpor a membrana nuclear, onde interage com o DNA para ativar a transcrição a diversos genes alvos. Entre seus alvos podemos citar genes relacionados à proliferação celular e diferenciação sexual masculina. A figura 3 representa um esquema do mecanismo de ação dos RA (32).





**Figura 3.** Sinalização do andrógeno e AR nas células da próstata. Depois da síntese testicular, a testosterona é transportada para tecidos alvos como a próstata e é convertida em DHT pela 5-alfa-redutase. DHT interage com o AR e o dissocia das HSPs (*heat-shock proteins*). O AR então vai para o núcleo onde se dimeriza e interage com os elementos responsivos de andrógeno (ARE) no promotor de genes alvos como o PSA e TMPRSS2. Na região promotora o AR recruta membros da maquinaria de transcrição (como a TATA-box *binding protein* (TBP) e o fator IIF (TFIIF)) em conjunto com outros coreguladores como os membros da família do p160 (*cAMP- response element-binding protein* ou CBP). Figura Adaptada de (32)

As células do câncer de próstata, assim como as células saudáveis da glândula, necessitam de andrógenos para crescer e proliferar e os RA são os principais reguladores desse processo (33). Perturbações na via do RA estão associadas como um dos primeiros eventos moleculares que levam a proliferação e crescimento anormal, que podem resultar em câncer de próstata. Mais de 100 mutações no RA já foram associadas à predisposição ao câncer de próstata (34).

Um exemplo importante é a superexpressão da família ETS (*E-twenty-six* uma família de fatores de transcrição) que se dá pela fusão da região promotora do TMPRSS2 (gene regulado pelo RA) com a região codificante do ETS *variant 1*. Essa fusão confere ao ETS alta responsividade a andrógenos que leva a progressão anormal do ciclo celular e está presente em aproximadamente 50% dos casos de câncer de próstata (35, 36). De maneira interessante, essa mutação depende do recrutamento de três enzimas, que

interagem diretamente com o DNA, pelo complexo DHT/RA e que pode levar a translocações cromossômicas (37, 38).

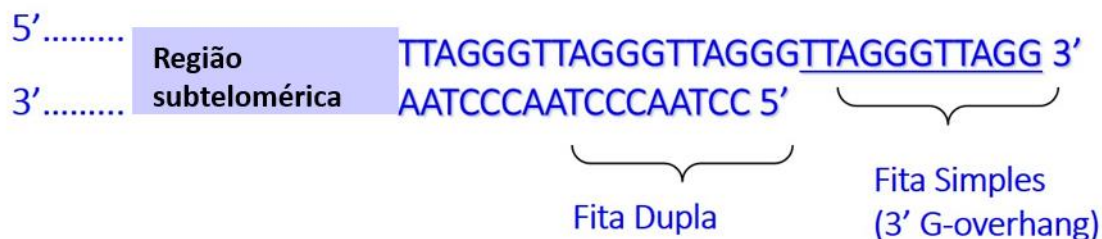
Entre outras alterações somáticas podemos destacar a metilação do gene GSTP1, que está presente em 90% dos carcinomas (39). Adicionalmente, a amplificação dos genes CMYC e BCL2 (ambos associados a apoptose) são muito frequentes em tumores metastáticos (40). Além disso, a reativação da telomerase é um evento primordial para a iniciação da carcinogênese e será mais detalhadamente discutida em seções subsequentes neste trabalho.

### 1.3 Características gerais dos telômeros.

Telômero (do grego, *telos*, final e *meros*, parte) é o nome dado a extremidade física dos cromossomos eucariotos. Tratam-se de complexos nucleoprotéicos que são os principais responsáveis por manter a estabilidade genômica da célula (41).

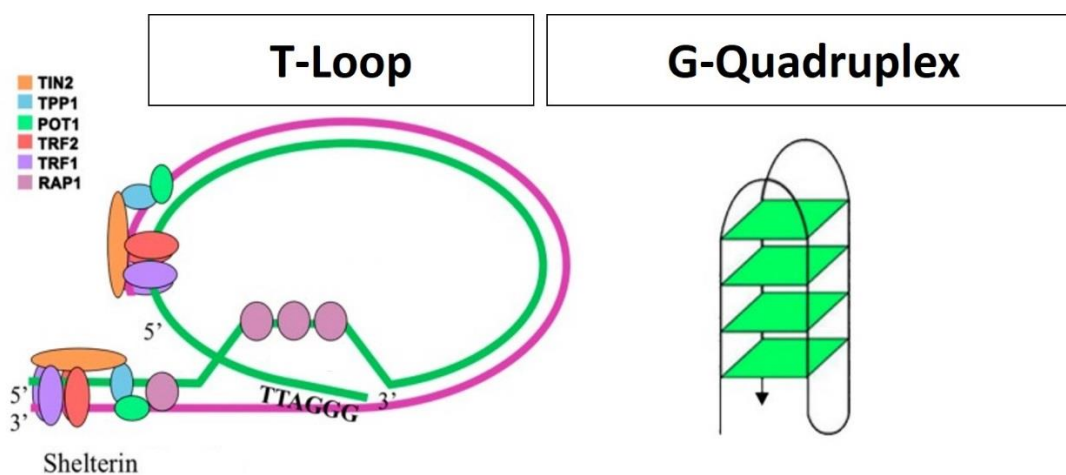
A estrutura telomérica é diferenciada em relação ao restante do cromossomo e é fundamental para a replicação completa do DNA durante a divisão celular. Além disso, está associada a diversos processos bioquímicos essenciais, como a senescência celular, controle do número de divisões celulares, regulação da transcrição de genes e manutenção da estabilidade/integridade genômica e de toda a estrutura do núcleo (42, 43).

O telômero é formado por pequenas repetições conservadas que apresentam uma fita rica em guaninas (Fita G) e a fita complementar rica em citosinas (Fita C). A fita G forma uma protusão na extremidade, 3' *G-overhang*, o que faz com que o telômero tenha uma região de dupla fita e uma de simples fita. A 3' *G-overhang* é utilizada como substrato para o alongamento dos telômeros pela enzima telomerase, com posterior síntese da fita complementar pela DNA polimerase  $\alpha$  (44, 45). A figura 4 representa a estrutura básica de um telômero humano, cuja sequência é formada por repetições do tipo 5'-TTAGGG-3' e extensão variando de 5.000 a 15.000 pares de base (46, 47).



**Figura 4.** Estrutura básica do DNA telomérico humano. Na imagem podemos ver a repetição telomérica composta por 6 pares de base do tipo 5' TTAGGG 3' e que o telômero apresenta uma região de dupla fita e outra de simples fita.

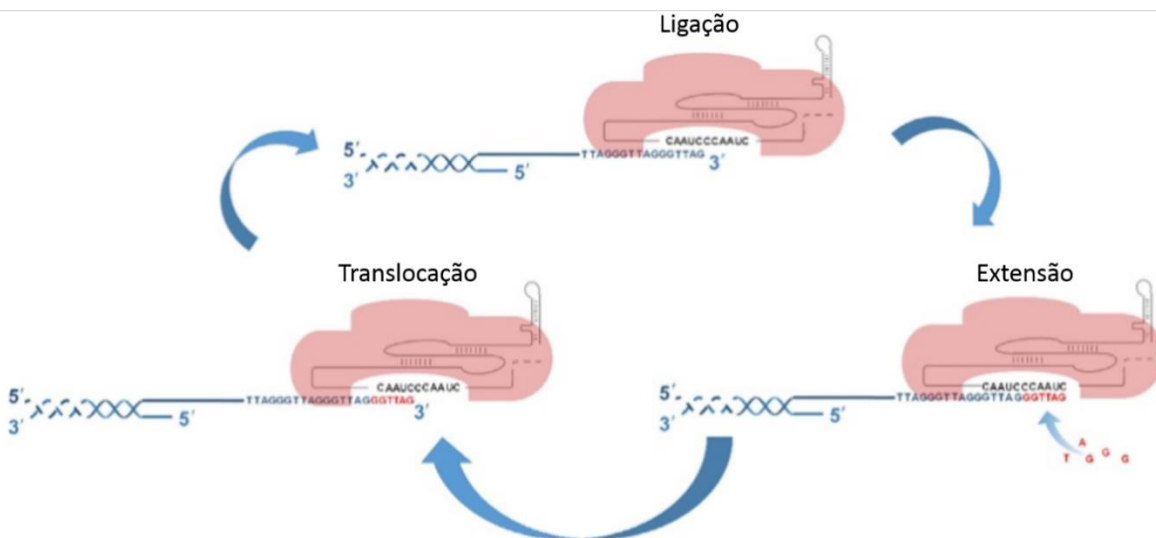
A 3' *G-overhang* pode assumir diferentes conformações. Uma delas é a de *T-loops*, que consiste na invasão da fita simples na fita dupla que forma uma estrutura semelhante à de um laço. A outra é de G-quadruplex na qual as guaninas da fita G interagem formando uma estrutura de quarteto (G4 DNA). Tanto os *T-loops* quanto os G-quadruplex são mantidos por proteínas da maquinaria telomérica e tem a função de proteger o telômero de ataques da maquinaria enzimática e da maquinaria de reparo ao DNA, além de participar do controle do acesso da telomerase ao DNA telomérico (48). A figura 5 abaixo ilustra ambas as estruturas.



**Figura 5.** O DNA telomérico pode assumir conformações alternativas como T-loops e G-quadruplexes, que podem exercer papéis na proteção dos telômeros contra a maquinaria de reparo celular e controlar o acesso da telomerase ao DNA. Na figura vemos o esquema estrutural de ambas as estruturas, com as proteínas do complexo shelterin destacadas na formação do T-loop. Figura adaptada de (49).

Outra característica importante dos telômeros está em sua replicação: a biologia convencional da replicação do DNA não permite que os finais dos cromossomos sejam completamente duplicados pelas DNAs polimerases, o que resultaria na perda de material genético a cada divisão celular. Esse paradoxo foi conhecido como “o problema do final da replicação” e só foi solucionado na década de 80, com a descoberta da enzima telomerase, a principal responsável pela replicação telomérica (50).

A telomerase é uma ribonucleoproteína (RNP) que atua como uma transcriptase reversa especializada, e é formada por dois componentes principais: a TERT (telomerase transcriptase reversa), e o TERC (componente RNA da telomerase). TERT é uma proteína que atua como a subunidade catalítica da enzima, ou seja, faz a reação de adição de DNA ao telômero. Já TERC é um longo RNA não codificante, que contém uma pequena sequência que é usada como molde para a telomerase replicar os telômeros. A simples presença da TERT e do TERC é suficiente para a replicação telomérica *in vitro*, contudo, outros componentes são necessários para a atividade de telomerase *in vivo* (48, 51). A figura 6 representa o ciclo esquematizado do funcionamento da telomerase.



**Figura 6.** Representação esquemática da reação de adição de DNA telomérico pela telomerase. A ação da telomerase é cíclica, onde a primeira etapa ocorre com a interação entre a sequência molde do RNA da telomerase com a extremidade 3'-G overhang, seguido da adição de nucleotídeos e a translocação da enzima. Imagem adaptada de (52).

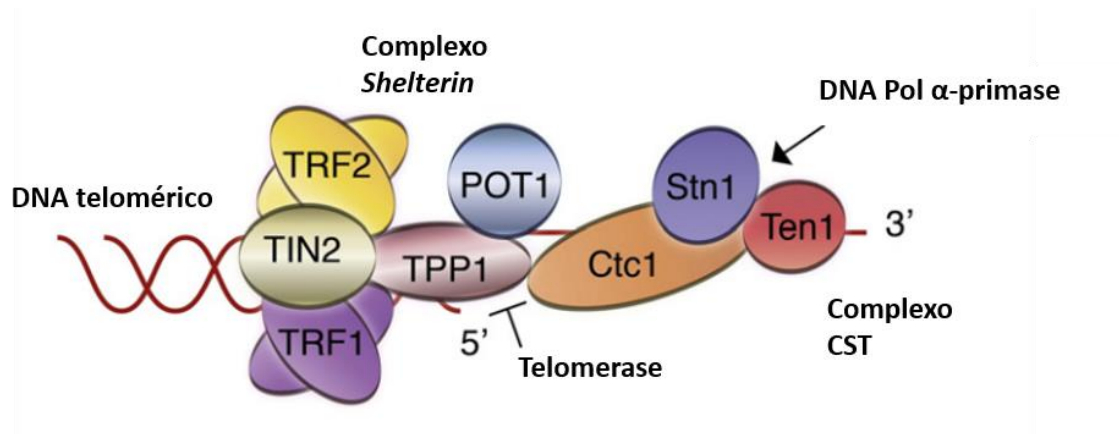
Além da telomerase, existem diversas outras proteínas que participam dos mecanismos de manutenção telomérica. Algumas dessas proteínas controlam o acesso e

o recrutamento da telomerase (53). Os complexos proteicos são dinâmicos, variando sua composição de acordo com a fase do ciclo celular, idade da célula e em resposta a estímulos externos (54, 55). Proteínas teloméricas têm diferentes formas de ação, podendo interagir diretamente com o DNA, com outras proteínas teloméricas ou ainda com componentes da maquinaria de reparo e resposta a danos ao DNA. Essas proteínas apresentam diversas funções, sempre relacionadas à região do telômero com qual interagem. (53, 56). Os principais complexos de manutenção telomérica são: o shelterin (*shelter* do inglês, abrigo) e o CST.

O complexo shelterin é formado pelas proteínas TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*), TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*), TIN2 (*TRF1-interacting protein 2*), POT1 (*protection of telomeres protein 1*), TPP1 (*TIN2- and POT1-interacting protein*) e RAP1 (*repressor/ activator protein 1*). Este é considerado o principal complexo de manutenção telomérica em mamíferos, tendo suas funções associadas à proteção dos telômeros (participando da manutenção dos T-loops) e regulação do tamanho telomérico (regulando o acesso da telomerase ao DNA telomérico) (56, 57).

Já o complexo CST é formado pelas proteínas CTC1 (*CST telomere replication complex component 1*), STN1 (*STN1, CST complex subunit*) e TEN1 (*TEN1, CST complex subunit*). Diferentemente do shelterin, o complexo CST está presente na grande maioria dos eucariotos, e tem sua função associada à homeostase telomérica. Mais especificamente, ele está associado à regulação do tamanho telomérico por controlar o acesso da telomerase e da DNA Pol  $\alpha$ -primase para o final da replicação da Fita G e da Fita C (58, 59). Além disso, evidências recentes mostraram que o complexo CST tem a capacidade de desfazer os G-Quadruplex dos telômeros durante a replicação do DNA (60).

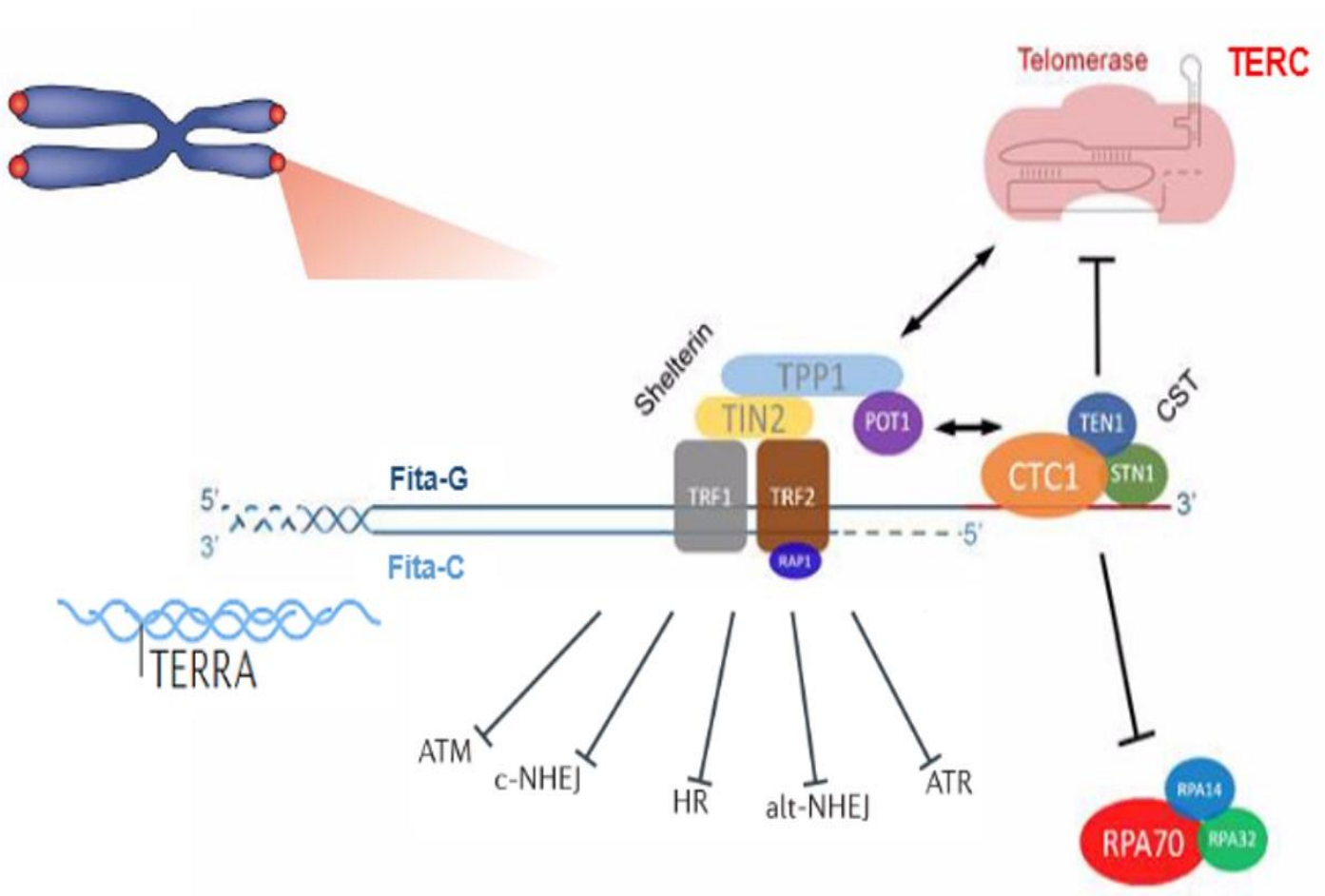
Uma informação interessante é que tanto o complexo CST quanto a proteína POT1 (presente no *shelterin*) são consideradas RPA-like. Tais proteínas apresentam uma relação filogenética direta com o complexo proteico RPA (*replication protein A*). O complexo RPA atua em diversas fases do metabolismo do DNA, incluindo o recrutamento da maquinaria de reparo aos telômeros (58). A figura 7 representa a associação do complexo *shelterin* e CST nos telômeros.



**Figura 7.** Associação entre o complexo shelterin e CST no DNA telomérico. Aqui fica evidenciado que a interação entre os complexos ocorre entre a TPP1 e a CTC1 e que ambos os complexos atuam em conjunto para manter a homeostase telomérica. Figura adaptada de (58).

Além de proteínas, existem alguns RNAs que atuam nos telômeros. A visão clássica era que os telômeros eram formados somente por regiões não codificantes, porém recentemente foi identificado que existem certos transcritos teloméricos. Tais transcritos são longos RNAs não codificantes, que, provavelmente tem sua função relacionada com a manutenção telomérica. O mais estudado e conhecido entre eles é o TERRA (Telomeric Repeat containing RNA), o qual tem origem na região subtelomérica da fita C e cuja função (apesar de não estar completamente elucidada) está relacionada a manutenção dos telômeros, via associação direta com o DNA e/ou proteínas teloméricas (61, 62).

Sabemos que os complexos *shelterin*, CST, telomerase e TERRA atuam em sincronia para garantir o funcionamento correto dos telômeros. A figura 8 ilustra essa relação.



**Figura 8.** A ação orquestrada dos complexos shelterin e CST na regulação da replicação do DNA telomérico. Nos terminais dos cromossomos, a telomerase pode ser recrutada pela interação entre a TPP1 e a POT1. A elongação telomérica é finalizada pela telomerase quando o complexo CST se liga ao 3'overhang recém-sintetizado (linha vermelha). O complexo CST também interage com a DNA Pol  $\alpha$ -primase para promover a síntese da fita C (linha verde pontilhada). Os complexos shelterin e CST inibem o acesso da RPA aos telômeros, bloqueando a ação da maquinaria de reparo a danos ao DNA. Na figura, também podemos ver a presença do TERRA, cujas funções ainda precisam ser elucidadas. Imagem adaptada de (52).

## 1.4 Telômeros e câncer.

### 1.4.1 Características gerais:

Os telômeros são estruturas de extrema importância na biogênese do câncer, visto que estão diretamente relacionados com o processo de imortalização celular e instabilidade genômica (63). Em 1965, Hayflick observou que células em cultura não podiam proliferar indefinidamente, ou seja, após certo número de divisões celulares elas atingiam a capacidade máxima proliferativa. Esse processo ficou conhecido como

“Limite de Hayflick” (64). Mais tarde, esse fenômeno foi associado à senescência celular, no qual o telômero é a principal estrutura envolvida no processo.

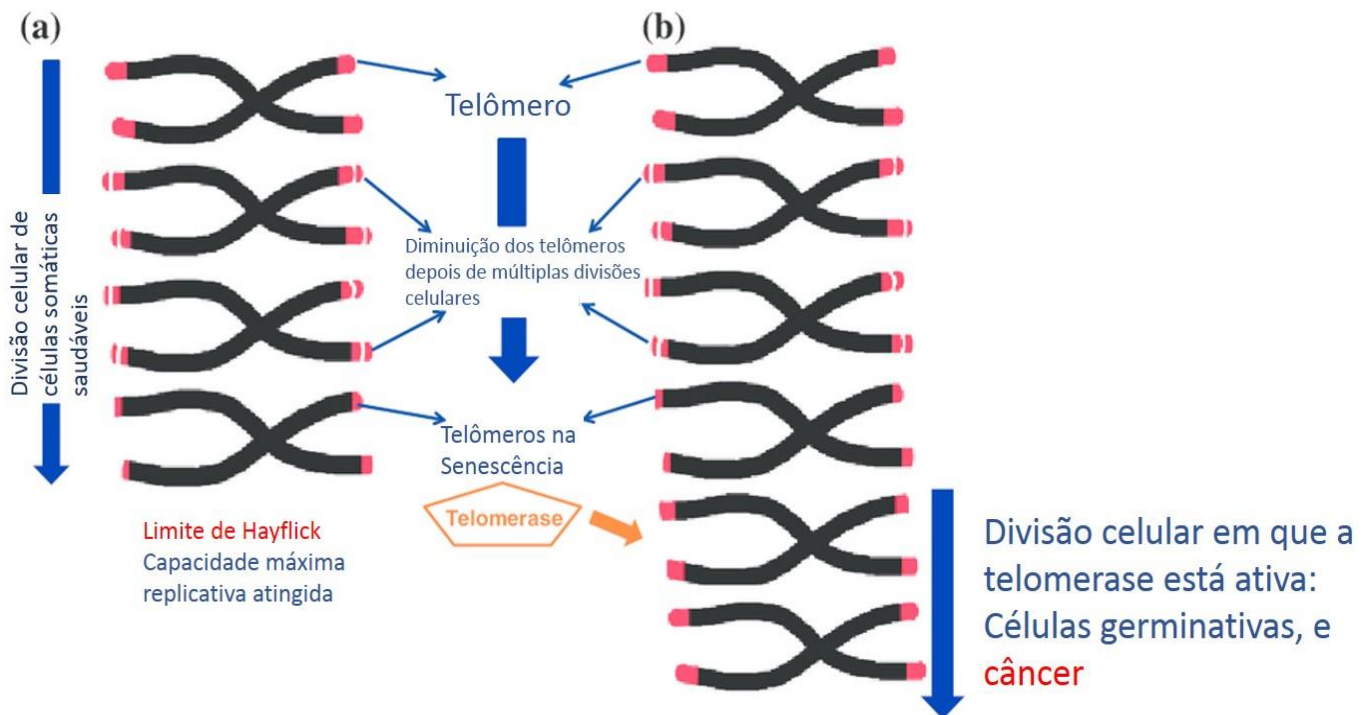
Como já citado anteriormente, a telomerase é essencial para a replicação telomérica, porém, sua expressão é extremamente regulada em eucariotos multicelulares. Apenas se detecta a presença da enzima durante períodos iniciais da embriogênese, em células germinativas e em tecidos que contém subpopulações de células tronco (como pele, fígado, medula óssea e intestino). Ou seja, na grande maioria das células somáticas, não temos expressão da telomerase (65, 66, 67, 68, 69, 70, 71). Em consequência da ausência da telomerase, os telômeros das células somáticas encurtam em cada divisão celular. Quando os telômeros tornam-se criticamente pequenos, uma cascata bioquímica é ativada sinalizando para a interrupção do ciclo celular, fazendo com que a célula entre em senescência e/ou apoptose. Por conta disso os telômeros são considerados os “relógios moleculares” da célula. Esse processo tem papel protetivo, já que evita o acúmulo de mutações genéticas (que podem acontecer naturalmente ou por fatores externos). Se as células pudessem proliferar indefinidamente acumulariam muitas mutações, o que pode originar problemas para todo o organismo, como por exemplo, a iniciação de um câncer (72).

No câncer, as células se dividem indefinidamente, superando o limite de Hayflick e, portanto, sobrepondo o papel regulatório dos telômeros. Em humanos, para superar a crise natural, as células precisam perder a função de genes *checkpoints* críticos do ciclo celular como: *TP53*, *p16INK4a* (*cyclin-dependent kinase-4 inhibitor*) e *pRB* (*RB transcriptional corepressor 1*) e/ou da maquinaria de reparo à danos ao DNA. Tais células acumularam mutações múltiplas e conseguem reativar um mecanismo para a manutenção dos telômeros, mantendo sua viabilidade proliferativa e atingindo sua imortalização celular (73, 74).

A reativação da telomerase é o caminho mais comum para a imortalização celular (visto que ela mantém os telômeros num tamanho que previne a instabilidade genômica intolerável), estando presente em 85 a 90% dos tumores malignos. Isso faz com que a enzima tenha um grande potencial terapêutico e diagnóstico (3, 73). Estudos mostram que a inibição da telomerase gera uma atividade supressora tumoral em diversos tipos de câncer (68, 75, 76). Os 10 a 15% dos cânceres que não reexpressam a telomerase apresentam um mecanismo alternativo para a manutenção dos telômeros (ALT), normalmente associados à recombinação homóloga (77). Isso é fundamental para



entender a importância entre telômeros e a carcinogênese: apesar do câncer ser um nome genérico para diversas doenças diferentes, todos eles precisam encontrar uma maneira de manter os telômeros, do contrário, eles não adquirem a imortalização celular, uma etapa obrigatória para o estabelecimento da doença (3). A figura 9 mostra de forma esquemática a relação entre telômeros, limite de Hayflick e câncer.



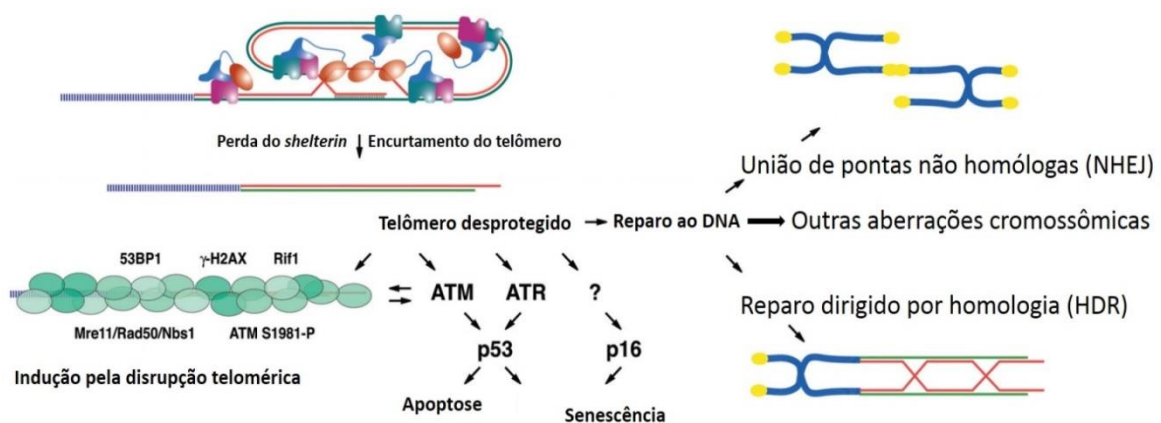
**Figura 9.** Esquema que representa o encurtamento telomérico progressivo durante sucessivas divisões celulares. Em (a) temos células somáticas saudáveis que atingem o limite máximo replicativo (Limite de Hayflick), em (b) temos células que expressam a telomerase e mantêm capacidade replicativa indefinidamente. Figura adaptada de (78).

Além de fundamental no processo de imortalização celular, os telômeros agem diretamente na instabilidade genômica presente em células cancerígenas.

Quando os telômeros ficam anormalmente curtos, a maquinaria proteica que realiza sua manutenção (principalmente componentes do complexo *shelterin*) pode ter sua função comprometida ou perdida. Isso faz com que ocorra a desproteção telomérica e o reconhecimento dos telômeros pela maquinaria de reparo a danos ao DNA (principalmente pelo fato da 3'G-overhang ser estruturalmente semelhante a quebra da dupla fita de DNA) (79).

Ao ficarem expostos à maquinaria de reparo, os telômeros desencadeiam respostas de várias cascatas bioquímicas, sendo as mais importantes delas: as vias das quinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM- and Rad3-related*) além da ação de mecanismos de reparo como: junção de pontas não homólogas (c-NHEJ, *classical non-homologous end joining* e alt-NHEJ, *alternative non-homologous end joining*) e recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*) (80). A ativação dessas vias nos telômeros pode culminar em diversas aberrações cromossômicas (79).

Tais aberrações geram diversas mutações no DNA (podendo inclusive ocorrer a ativação da telomerase e/ou problemas em outras proteínas teloméricas) que criam um ambiente propício para a transformação maligna. A figura 10 a seguir exemplifica o modelo básico de como o encurtamento telomérico contribui para a instabilidade genômica.



**Figura 10.** Esquema básico de como o encurtamento telomérico pode gerar a instabilidade genômica. Na imagem vemos que o encurtamento telomérico excessivo e/ou problemas no complexo shelterin deixam os telômeros desprotegidos. A partir daí, a 3' G-overhang é reconhecida pela maquinaria de reparo, que na ausência de supressores tumorais, podem gerar aberrações cromossômicas e mutações. Imagem adaptada de (79).

Em nível de reflexão, podemos perceber como o telômero pode ter tanto papel oncogênico como o de supressor tumoral. Se por um lado telômeros curtos podem levar a senescência celular e impedir a progressão de lesões pré-malignas, por outro, telômeros anormalmente curtos podem gerar instabilidade genômica criando o ambiente propício para o acúmulo de mutação e aparecimento do câncer. Já telômeros longos podem prevenir a instabilidade genômica e ao mesmo tempo aumentar demais a capacidade proliferativa da célula, o que faz com que naturalmente a célula acumule mais mutações

(seja por influência de fatores externos ou por próprios erros naturais da maquinaria de replicação de DNA) podendo levar ao câncer.

#### 1.4.2 Shelterin e câncer:

O complexo shelterin, juntamente com a telomerase, é o principal responsável por realizar a manutenção telomérica, e exatamente por isso, seus componentes são regularmente associados a neoplasias (81). De fato, alterações na expressão de seus componentes já foram relatadas em diversos tipos de câncer como o de estômago, rim, mama, fígado, entre outros (82, 83, 84, 85).

A proteína TPP1 apresenta uma região denominada *TEL patch* que tem função associada ao recrutamento da telomerase (86, 87, 88). Estudos *in vitro* sugerem que mutações nessa região podem influenciar o recrutamento da telomerase (em células tumorais que reativam a enzima), conferindo uma função protetiva reduzindo a proliferação e aumentando a morte celular (89).

A proteína POT1 se liga à 3'-*overhang* com a função de proteger essa região. Algumas variantes dessa proteína parecem contribuir para o aparecimento de telômeros anormalmente longos, estando diretamente relacionados a alguns tipos de câncer como: melanoma familiar, glioma familiar e leucemia linfocítica crônica (90, 91, 92, 93, 94).

A principal função da TRF1 é regular o comprimento do telômero por controlar a atividade da telomerase (95). Esse fato confere potencial de supressor tumoral para a proteína, o que fica demonstrado em uma pesquisa com roedores no qual a inibição da TRF1 reduz o tamanho e o grau de malignidade em carcinoma de pulmão (96).

A proteína TRF2 é essencial para a proteção telomérica, e sua deficiência está associada ao encurtamento telomérico e ao câncer. A expressão da TRF2 (juntamente com as proteínas TRF1 e TIN2) tem sua expressão aumentada em lesões pré-malignas gástricas (82). Além disso, TRF2 interage com certos componentes da maquinaria de reparo influenciando as aberrações teloméricas comuns em câncer (95).

Mutantes da proteína TIN2 são associados a diversas formas de disqueratose congênita (97). Isso provavelmente se deve ao fato, de que essas mutantes, associadas a

deficiências da POT1 levam ao aumento da desproteção da 3'G- *overhang*, que pode contribuir para fusões cromossômicas (98, 99, 100, 101).

A proteína RAP1 previne a fragilidade e recombinação telomérica pela sua interação com a TRF2 (95). A RAP1 em associação com a TRF2 é essencial na resposta ao dano ao DNA em linhagens celulares de câncer gástrico (102).

#### 1.4.3 CST e câncer

Além do complexo *shelterin*, outras proteínas são de extrema importância para manter a estrutura telomérica, e a deficiência dessas proteínas pode comprometer a homeostase do telômero como um todo, estando diretamente relacionada ao processo de tumorigênese (103).

O já citado complexo CST, tem sua importância na doença. Dado sua importância na replicação do DNA, sua deficiência pode gerar disfunção telomérica severa. Já foi demonstrado a superexpressão da CTC1, STN1 e TEN1 em câncer de mama e osteosarcomas (104). Mutações da CTC1 também são diretamente relacionada com a doença de Coats, uma rara síndrome neurológica causada pelo mau funcionamento do complexo CST (105).

Um trabalho recente nos mostra que a CTC1 e STN1 co-localizam com marcadores clássicos de *ALT*. Além disso, a depleção aguda de STN1 limita a proliferação de células de osteosarcoma com fenótipo de manutenção alternativa dos telômeros. Isso sugere que o complexo CST pode ter papel fundamental na regulação telomérica de células tumorais que não expressam a telomerase (106).

#### 1.4.4 TERRA e câncer

O RNA telomérico TERRA foi identificado recentemente, e por isso existe pouca informação na literatura de como ele pode estar associado a doenças. Apesar disso, como já mencionado anteriormente, ele é fundamental para a biologia dos telômeros e, portanto, deve influenciar em processos patológicos. Exemplificando isso, um estudo recente

relatou que a subexpressão de TERRA está associado à sarcopenia, e que sua expressão pode ser modulada por dieta e exercício físico (107).

Além disso, diversas evidências demonstram que a expressão do TERRA está diretamente associado ao fenótipo ALT, pode regular a atividade da telomerase e se relaciona com vias de respostas a dano ao DNA telomérico, características importantes a células malignas (108).

### **1.5 Telômeros e câncer de próstata.**

Os telômeros e seus componentes tem um papel fundamental na fisiopatologia do CP, onde são considerados um grande potencial terapêutico, diagnóstico e prognóstico para a doença (109).

A instabilidade cromossômica causada pela disfunção telomérica é um evento chave para a iniciação do CP, e isso fica evidente quando o encurtamento telomérico é considerado um dos primeiros eventos moleculares na oncogênese da neoplasia (109).

Diversos motivos podem contribuir para o encurtamento anormal dos telômeros, e um destes é o dano ao DNA causada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*). Os telômeros são particularmente suscetíveis aos ROS, pois além de serem ricos em guaninas, a maquinaria de reparo normalmente não age sobre eles (110). Vale lembrar que uma das primeiras alterações moleculares no CP é o silenciamento de GSTP1 e este gene é responsável por um importante mecanismo protetor contra os danos causados por ROS (111).

Inflamação crônica causada pelos mais diversos motivos (como por exemplo: infecções, dieta, trauma mecânico, entre outros) está diretamente associada a diversos tipos de câncer, incluindo o de próstata (112, 113). Um provável mecanismo é que a inflamação crônica gera ROS, que leva os telômeros a ficarem criticamente curtos levando a instabilidade genômica, acompanhada por aberrações cromossômicas e acúmulo de mutações, que finalmente inicia a transformação maligna nas células da próstata.

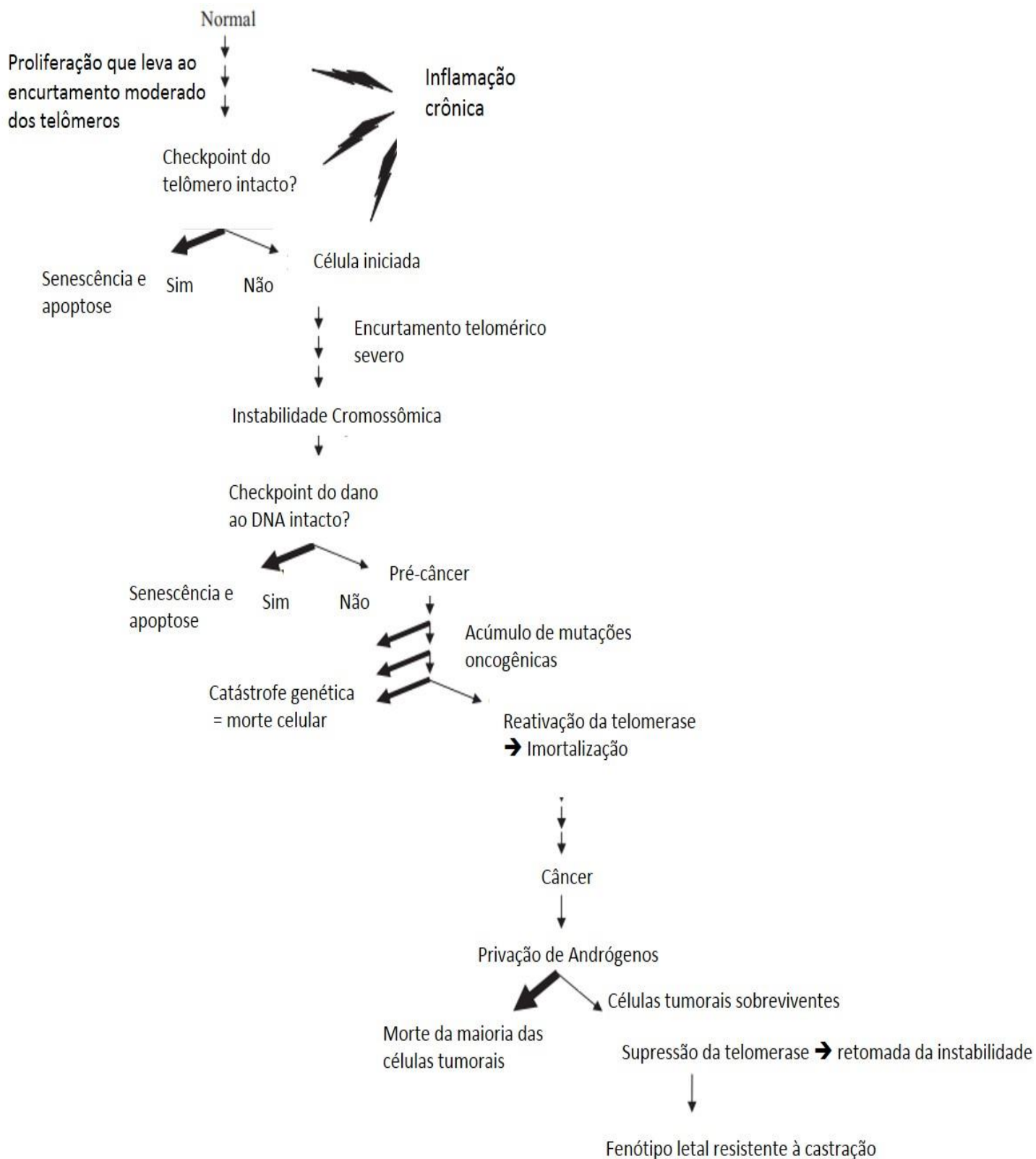
Apesar de o fenótipo ALT estar presente no CP metastático, o fenômeno não foi observado em tumores localizados, ou seja, podemos afirmar que a ativação da telomerase

é uma etapa obrigatória para a biogênese do CP. Confirmando isso, a expressão aumentada da telomerase é relatada em diversos tipos da neoplasia (114, 115). Na próstata a atividade da telomerase é diretamente relacionada ao RA. Normalmente o RA se liga ao promotor da TERT e coopera com o p53 para a inibição da enzima (116).

Porém, alterações nos RA fazem com que ele tenha a função contrária no câncer: em linhagens celulares de CP, é observado que os RA ativem a expressão da TERT. Isso é confirmada quando observamos a diminuição da expressão da TERT ao tratar células RA positivas com MAS (*methaneseleninic acid*), que diminui a expressão proteica dos RA (117). Também existem evidências que os RA regulam a atividade do complexo shelterin na doença, o que faz com que tais receptores contribuam diretamente para a desregulação telomérica (118). Na realidade, hoje sabemos que a ação hormonal (incluindo os andrógenos) é fundamental para a manutenção telomérica, com implicações relevantes em tumores hormônio-dependente, como CP (119).

Outro mecanismo é a contribuição do oncogene MYC e do fator de transcrição SP1 na superexpressão da TERT. O promotor da TERT contém cinco *GC-boxes*, que podem ser reconhecidos pelo fator de transcrição SP1, e duas *E-boxes* que podem ser reconhecidos pelo MYC. Juntos, o MYC e o SP1 atuam cooperativamente para promover à expressão da TERT no CP. A superexpressão do MYC e SP1 é suficiente para a reativação da telomerase (120, 121).

A figura 11 representa um modelo que propõe de forma resumida o papel dos telômeros e seus componentes na iniciação e progressão do CP.



**Figura 11.** Modelo teórico que ilustra o papel dos telômeros na progressão do câncer de próstata. Figura adaptada de (122).

## 1.6 Justificativa

Os telômeros estão diretamente relacionados com o processo patológico do CP, tendo um grande potencial terapêutico, diagnóstico e prognóstico que pode auxiliar na prática clínica da doença. A manutenção dos telômeros é realizada principalmente pelos complexos da telomerase, CST, shelterin e pelo TERRA. Apesar disso, informações sobre a expressão de seus componentes são escassas e com pouca relação com parâmetros clínicos, mecanismos moleculares e implicações na progressão do CP, justificando a realização de um trabalho sobre o assunto. No presente estudo avaliamos a expressão dos componentes destes complexos durante os estágios da progressão do CP, relacionando os dados de expressão com parâmetros clínicos e tamanho telomérico visando, encontrar possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos além de elucidar o papel dessas moléculas na doença.



## **2. Objetivos**

## 2.1 Objetivo Primário

Avaliar o papel dos componentes dos complexos shelterin, CST, telomerase, TERRA e tamanho telomérico tumoral na progressão do câncer de próstata.

## 2.2 Objetivos Secundários

- Verificar mutações e alterações no número de cópias (CNVs) dos complexos shelterin (POT1, TRF1, TRF2, TIN2, TPP1 e RAP1), telomerase (TERT e TERC) e CST (CTC1, STN1 e TEN1) a partir de análises de bioinformática em coortes de CP.
- Avaliar a expressão gênica de cada componente dos complexos shelterin, telomerase, CST utilizando análises de bioinformática em coortes de CP.
- Avaliar a expressão gênica de cada componente dos complexos shelterin, telomerase, CST e TERRA a partir de dados experimentais de espécimes cirúrgicas e linhagens celulares de CP.
- Medir o tamanho do telômero de espécimes cirúrgicas e linhagens celulares de CP.
- Relacionar os dados de expressão gênica e do tamanho dos telômeros com parâmetros clínicos e com a progressão do CP.

## **3. Métodos**

### 3.1 Tipo de estudo

Esta tese consistiu em um estudo observacional retrospectivo não randomizado. Foi submetido e aprovado no comitê de ética de pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 3.196.078. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento de Livre e Esclarecido (TCLE) e foram informados sobre os possíveis riscos do estudo.

### 3.2 Época e local

A realização deste trabalho ocorreu entre abril de 2019 e dezembro de 2022 no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da disciplina de Urologia da FMUSP.

### 3.3 Casuística

#### 3.3.1 Análises de bioinformática

As alterações nos genes estudados foram avaliadas utilizando dados de coortes de CP do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (n=499) e SU2C / PCF (n=444) depositados no repositório público cBioPortal (123, 124, 125). A coorte do TCGA foi composta por amostras de câncer localizado e a coorte SU2C/PCF por biopsias de câncer de próstata metastático resistente a castração.

A avaliação da expressão gênica foi realizada utilizando os dados do TCGA do CP utilizando o software online GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) (126). A população do TCGA foi composta por 497 amostras de tumor localizado e 152 amostras de tecido normal. Nas curvas Kaplan–Meier a expressão foi normalizada utilizando o gene B2M como controle endógeno. O coeficiente de correlação foi determinado pelo método de Spearman.

Todas as imagens utilizadas são originais do cBioPortal e GEPIA com pequenos ajustes de estilo.

### 3.3.2 Amostras de Pacientes

Utilizamos 81 espécimes cirúrgicos de pacientes com CP tratados por prostatectomia radical no Hospital Sírio Libanês pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi. Como controle, analisamos 10 amostras de tecido prostático benigno (HPB), obtidos de glândulas hiperplásicas de pacientes operados pela mesma equipe. Todas as amostras passaram por análise histológica pelo mesmo patologista (Profa. Dra. Kátia Leite). As características clínicas dos pacientes estão resumidas na tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Características dos pacientes

<b>Grupo Controle (HPB)</b>	
Idade (anos) *	65,5 ( $\pm$ 2,80)
PSA pré operatório (ng/ml) *	9,62 ( $\pm$ 6,68)
Tamanho Prostático (cm <sup>3</sup> ) *	61,71 ( $\pm$ 20,55)
<b>Grupo Câncer (CP)</b>	
Idade (anos) *	60,57 ( $\pm$ 8,17)
PSA pré operatório (ng/ml) *	8,37 ( $\pm$ 9,20)
Volume Tumoral (%) *	18,98 ( $\pm$ 18,77)
Volume Tumoral (cm <sup>3</sup> ) *	9,28 ( $\pm$ 13,01)
<b>Estadiamento patológico (pT) **</b>	
pT2	52
pT3	29
<b>ISUP **</b>	
1	27
2	5
3	12
4	18
5	19
<b>Recidiva Bioquímica **</b>	
Sim	17
Não	52
Sem informação	12
<b>Risco (baseado em (30)) **</b>	
Muito Baixo ou Baixo	25
Intermediário favorável	3
Intermediário desfavorável	10
Alto	43

\* Média e desvio padrão; \*\* número absoluto (n)

### 3.3.3 Linhagens Celulares

Utilizamos como modelo metástases do CP as linhagens celulares LNCaP (derivada de metástase linfonodal, sensível a castração), DU145 (derivada de metástase cerebral, resistente a castração) e PC3 (derivada de metástase óssea, resistente a castração). Como controle, utilizamos a linhagem celular PNT2, derivada de um epitélio prostático normal imortalizado.

As células foram acondicionadas em placas de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura RPMI (LNCaP e PNT2) ou MEM (PC3 e DU145) (Life Technologies, Waltham, MA, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução antibiótica e antimicótica (Sigma Co, St Louis, MO, EUA) a 1%. As placas foram mantidas na estufa para culturas de células contendo atmosfera úmida composta por 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C.

Para as reações de PCR em tempo real utilizamos triplicatas das linhagens celulares. A autenticação das linhagens celulares foi realizada por ensaio de STR através do serviço disponível pela Rede Premium da FMUSP.

## 3.4 Métodos

### 3.4.1 Extração do RNA total

Para extração de RNA e microRNA foi utilizado o kit de isolamento miRVana®miRNA (Ambion, Austin, Tx, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA. As preparações das amostras de tecidos frescos foram realizadas em gelo e da maneira mais rápida possível para prevenir a degradação por proteases.

Foram adicionados 500µL do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização nas linhagens celulares e logo após os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol clorofórmio, e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade 10.000g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100%

a temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Neste momento o filtro contém RNA. Nos filtros com o RNA, foram realizadas lavagens com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 min a 10.000g para secagem da coluna. As colunas foram repassadas para um novo tubo e então adicionamos 100µL solução de eluição pré-aquecida a 95°C, no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente o RNA foi centrifugado e armazenado a -20°C até sua utilização. A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (260/280nM) (ND1000, Wilmington, EUA).

#### 3.4.2 *Transcrição reversa (RT)*

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA) que utiliza a Transcriptase reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em H<sub>2</sub>O livre de nucleases em um volume final de 40µl e concentração de 500µl/ng. A este volume foram acrescentados 4µl de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6µl do mix de dNTPs (25X), 4µl do tampão da enzima (10X), 2µl da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min) no termociclador Vertiti® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA).

O cDNA do microRNA 155 (e seu controle endógeno) foi obtido usando TaqMan® miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 500ng/µl de miRNA foi diluída em 20µl de água. Deste volume, 3µl foram submetidos à transcrição reversa, onde foram adicionados 7µl de mix contendo os reagentes do kit: 0,15µl de DNTP mix, 0,5µl da enzima transcriptase reversa, 1,5µl do tampão da enzima, 0,19µl de inibidor de RNase, 3,66µl de água livre de nucleasse e 1µl de primer stem-loop com sequência específica para os miRNA, totalizando 10µl de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Veriti® (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C. Ao final das reações os cDNA foram armazenados a -20 °C até o uso.

### 3.4.3 Análises de expressão de gênica por PCR em tempo real quantitativo

As expressões dos RNAs estudados foram avaliadas a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa no sistema ABI 7500 Fast RT-PCR no modo standard utilizando-se Master Mix PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As expressões dos RNA individuais foram analisadas utilizando sondas TaqMan® específicos, com seus códigos tabela 2. Este protocolo TaqMan® utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um quencher que absorve luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo quencher que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR. Para amplificação dos fragmentos desejados as reações foram feitas com 0,5µL de uma solução contendo um par de primer conforme tabela 3 e a sonda (com a marcação), 5µL do TaqMan Master Mix, 3,5µL de água nucleasse free e 1µL de cDNA, somando um total de 10µL para cada reação.

As condições das reações foram: 2min a 50°C, 10min a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. O nível de expressão dos genes alvo foi obtido pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando os genes B2M(genes) e RNU48 (miR-155) como controles endógenos das reações.

Especificamente para a determinação da expressão do TERRA, utilizamos o kit qPCRBIO SyGreen Mix (Wayne, Pennsylvania, EUA) que utiliza a metodologia de *Sybr Green* para determinar a expressão gênica. Basicamente, o *Sybr Green* é um intercalante de DNA dupla fita inespecífico que emite fluorescência toda vez que se liga no DNA recém-formado em uma reação de PCR. A sequência dos iniciadores do TERRA 1q2q10q13q foi retirada de (127) e está presente na tabela 2. A reação de expressão seguiu o protocolo do mesmo artigo.



**Tabela 2.** Sondas e iniciadores utilizados no trabalho

<b>Nome</b>	<b>Código</b>	
POT1	Hs00209984_m1	
TRF1	Hs00819517_mH	
TRF2	Hs01030567_m1	
TPP1	Hs00368526_g1	
TIN2	Hs01554307_g1	
RAP1	Hs01033742_m1	
TERT	Hs00972650_m1	
TERC	Hs03454202_s1	
CTC1	Hs00228274_m1	
STN1	Hs00372796_m1	
TEN1	Hs01079132_m1	
B2M	Hs_00187842_m1	
miR155	2623	
RNU48	1006	
<b>Nome</b>	<b>Foward</b>	<b>Reverse</b>
TERRA	GAATCCTGCGCACCGAGAT	CTGCACTTGAACCCTGCAATAC
MRef1	GGTGATGGGATTTCATTGATG	CTTCATTGACCTCAACTACATGG

#### 3.4.4 Determinação do tamanho do telômero por PCR em tempo real quantitativa

Para a determinação do tamanho telomérico, o DNA foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Primeiramente as amostras foram maceradas seguido de adição de 20µl de proteinase K e 200µl de solução de lise (Buffer AL). Então as amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados e foi adicionado 200µl de etanol 96 – 100%. Em seguida as amostras foram agitadas e centrifugadas. Depois, a amostra foi transferida para um novo tubo, contendo uma coluna de filtração fornecida pelo kit, seguido de centrifugação. Após o descarte do filtrado, a amostra passa por etapas de lavagem da coluna com 500µl das soluções Buffer AW1 e Buffer AW2, respectivamente. Após as lavagens, as colunas foram transferidas para um novo tubo, no qual será adicionado 200µl da solução de eluição (Buffer AE). Na etapa final, as amostras são incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e então centrifugadas.

A pureza e concentração do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nM).

Para mensurar o tamanho do telômero tumoral, utilizamos a técnica de PCR em tempo real quantitativa adaptada de (128). A técnica utiliza DNA genômico para realizar uma PCR em tempo real convencional com algumas modificações. Basicamente, utilizam-se iniciadores que se ligam aos segmentos ricos em citosinas (C) e guaninas (G), mas são incompatíveis nas outras bases; além de temperaturas mais baixas durante os primeiros dois ciclos da reação (permitindo que os iniciadores se liguem ou emparelhem com o DNA telomérico). Os ciclos remanescentes então são completados em temperaturas mais altas para amplificar somente os produtos específicos da amostra a partir dos dois primeiros ciclos. Na técnica original o tamanho telomérico é mensurado pela comparação do produto de amplificação do telômero (T) com um gene de cópia simples (S). A razão T/S é então utilizada para calcular um valor que se correlaciona com o comprimento médio dos telômeros.

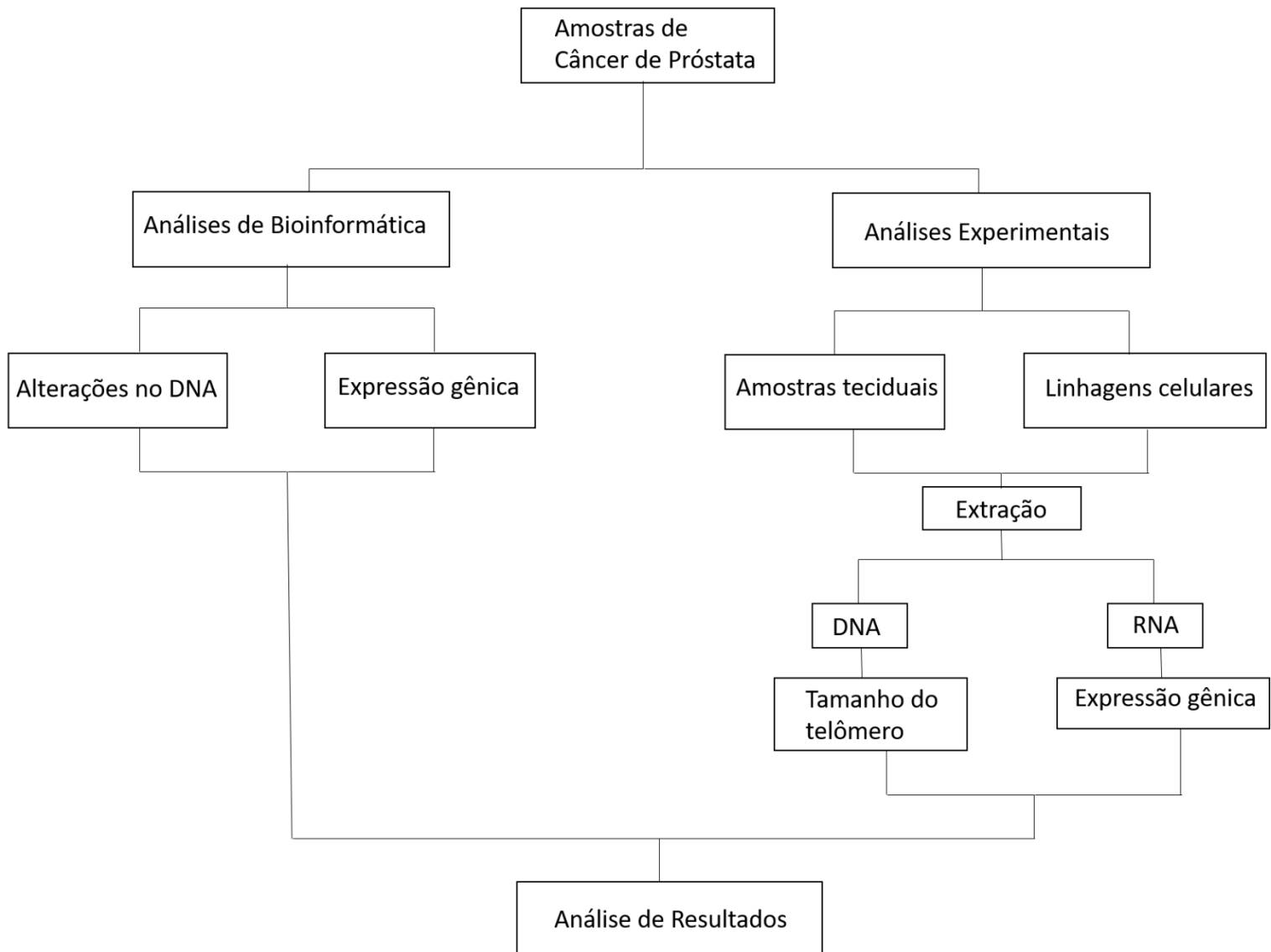
No DNA tumoral é comum a presença de aneuploidia, o que limita a utilização desta técnica, pois é difícil selecionar um gene de cópia simples universal. Para contornar esse problema, adaptamos a reação utilizando como controle uma sequência de DNA com múltiplas cópias espalhadas pelo genoma, o que melhora a normalização em amostras de câncer por atenuar os efeitos da aneuploidia. Essa estratégia foi proposta em (129), onde os autores demonstram sua eficiência inclusive em amostras de CP. O controle utilizado foi retirado desse mesmo artigo e sua sequência está descrita na tabela 2 (chamado de MRef1, como no artigo original).

Os pares de iniciadores para a sequência do telômero foram do kit Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell's, CA, EUA), com a reação já padronizada. O tamanho do telômero foi determinado em reações de 10  $\mu$ L contendo 0,5  $\mu$ L de cada iniciador, 3,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L de DNA e 5  $\mu$ L 2x qPCRBIO SyGreen Mix (Wayne, Pennsylvania, EUA). Cada reação utilizou 5ng de DNA.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA). As condições de reação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos 95°C e 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 52°C e 45 segundos a 72°C. As reações foram realizadas em duplicatas.

### 3.4.5 Delineamento Experimental

A figura 12 a seguir representa de forma esquematizada o delineamento experimental deste trabalho.



**Figura 12.** Delineamento experimental esquematizado.

### 3.6 Desfechos

Os dados obtidos foram avaliados da seguinte forma:

- Verificamos se as alterações genômicas (mutações e CNVs) podem diferenciar o CP localizado do CPRC.

- Analisamos se a expressão gênica dos componentes da maquinaria telomérica e o tamanho do telômero pode diferenciar o CP localizado do grupo controle.
- Os dados de expressão gênica da coorte do TCGA foram associados com curvas de sobrevida global e livre de doença. O ponto de corte utilizado foi a mediana da expressão gênica.
- A expressão gênica e o tamanho do telômero da coorte clínica correlacionados com os seguintes fatores prognósticos: níveis de PSA pré-operatório (considerando 10 ng/ml como ponto de corte e correlação direta), volume tumoral (em cm<sup>3</sup> e porcentagem da próstata acometida pelo tumor), estadiamento patológico (pT2 versus pT3), escore da ISUP (cada grupo representando um estágio do escore), risco do câncer (categorizamos os dados de acordo com seu risco e analisamos por testes de correlação) e recidiva bioquímica (presença versus ausência). Consideramos recidiva bioquímica quando os níveis de PSA sérico ultrapassaram 0,2 ng/ml após tratamento. Para facilitar a visualização dos resultados somente os resultados significativos (ou com valores de p próximos a 0,05) serão apresentados.
- Avaliamos se os valores de expressão gênica e do tamanho dos telômeros podem diferenciar as linhagens celulares utilizadas. Mais especificamente, verificamos se os dados podem diferenciar 1- As células de CP metastático das células do epitélio prostático normal e 2- A linhagem sensível a bloqueio androgênico (LNCaP) das células de CPRC (DU145 e PC3).

### **3.7 Análise estatística**

Os resultados experimentais de expressão gênica e tamanho dos telômeros foi obtido pelo software DataAssist v3.01. Os gráficos e análise estatística foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.

Todas as variáveis passaram por pelo teste D'Agostino & Pearson para verificar se elas apresentavam ou não distribuição normal. Caso apresentassem distribuição gaussiana, foram submetidas aos testes de hipóteses Teste T de Student, ANOVA com post-hoc de Bonferroni e correlação de Pearson. Caso não apresentassem distribuição gaussiana, foram submetidas aos testes de hipóteses Teste de Mann-Whitney, ANOVA não paramétrica com post-hoc de Dunn e correlação de Spearman. O teste de contingência utilizado foi exato de Fischer.

Para todas as análises estatísticas, nós consideramos um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) para rejeitar a hipótese de nulidade.

### **3.8 Financiamento**

Este estudo foi financiado pela verba institucional do Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da disciplina de Urologia da FMUSP e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob número 88887.464553/2019-00.

## **4. Resultados**

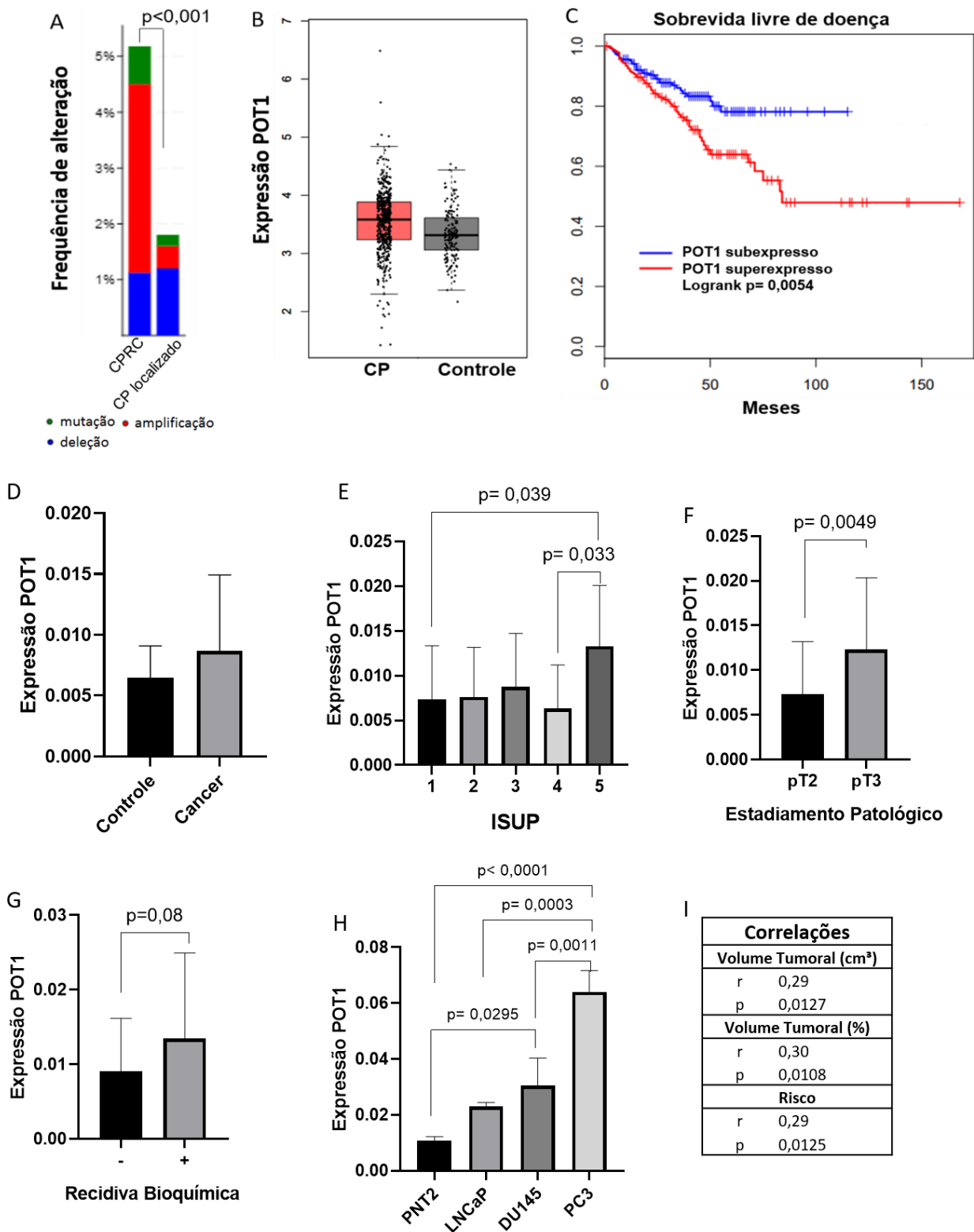
## 4.1 Complexo Shelterin

### 4.1.1 POT1

Na figura 13A verificamos que as alterações genômicas da POT1 não são comuns no CP, no câncer localizado menos de 2% das amostras tem alguma alteração e no câncer de próstata metastático resistente a castração (CPRC) pouco mais de 5% das amostras estão alteradas. O número de deleções é bastante similar entre as duas coortes, porém, o número de mutações e, principalmente, de ampliações é relativamente maior no CPRC ( $p < 0,001$ ) o que indica que o aumento da POT1 pode estar relacionado com a aquisição do fenótipo metastático.

Quando analisamos a expressão gênica, verificamos uma discreta superexpressão sem significância estatística no CP em relação ao controle, tanto na coorte do TCGA (Figura 13B) quanto na coorte clínica (Figura 13D). Porém, os tumores mais agressivos tendem a expressar mais POT1. Na coorte do TCGA verificamos uma pior sobrevida livre de doença nos pacientes que apresentam expressão da POT1 acima da mediana (Figura 13C,  $p = 0,00054$ ). Na coorte clínica, os tumores de escore de ISUP 5 (Figura 13E) e os que não estão confinados à próstata também exibem maior expressão de POT1 (Figura 13F,  $p = 0,0049$ ). Além disso, temos um aumento da expressão de POT1 em pacientes que posteriormente tiveram recidiva bioquímica, com significância estatística marginal (Figura 13G,  $p = 0,08$ ). Ainda, a maior expressão de POT1 se correlaciona com maior volume tumoral (em  $\text{cm}^3$  e porcentagem) e com o maior risco do câncer (Figura 13I)

Finalmente, na figura 13H é possível ver um aumento progressivo na expressão de POT1 nas linhagens celulares, onde a menor expressão está presente na PNT2 (epitélio normal), seguido da LNCaP (sensível a castração, modelo próximo de uma doença localmente agressiva) e por fim da DU145 e PC3 (modelos CPRC altamente agressivos). Aqui vale ressaltar que a PC3 é considerada a célula com maior potencial metastático e agressividade e apresenta a maior expressão da POT1 (130).



**Figura 13.** Envolvimento de POT1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E, F e G temos a relação da expressão de POT1 com fatores prognóstico (ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em H temos a expressão de POT1 nas linhagens celulares. Em I temos as correlações entre níveis de expressão e volume tumoral (em cm<sup>3</sup> e porcentagem) e com o risco do câncer, respectivamente.



#### 4.1.2 TRF1

Os resultados obtidos das análises de TRF1 fogem do padrão do resto do trabalho, e exatamente por isso foram feitas algumas análises adicionais. Esses dados estão resumidos na figura 14.

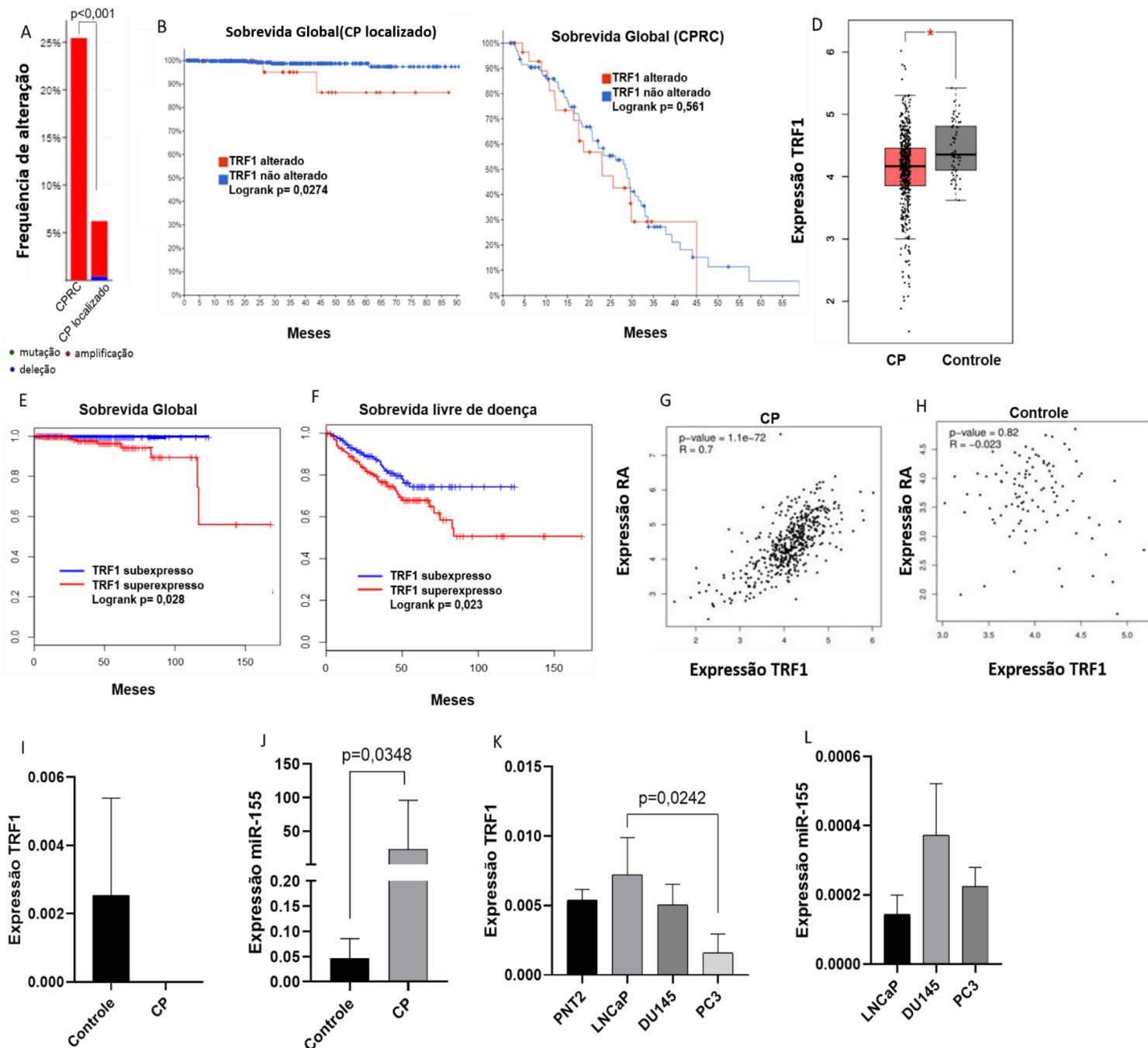
Na figura 14A vemos que cerca de 5% dos tumores localizados apresentam alterações em TRF1, a maioria delas do tipo amplificação, já na coorte do CPRC temos um grande enriquecimento no número de amplificações ( $p < 0,001$ ) com cerca de 25% das amostras apresentando amplificações em TRF1. Além disso, análises no cBioportal demonstram que as amplificações de TRF1 são acompanhadas pelo aumento da expressão gênica (dados não mostrados).

No CP localizado, os pacientes sem alterações em TRF1 tiveram uma melhor sobrevida global (Figura 14B,  $p = 0,027$ ), mas na coorte CPRC amplificações em TRF1 não alteraram a sobrevida global dos pacientes (Figura 14C,  $p = 0,561$ ).

Em relação a sua expressão, vemos uma discreta, porém significativa subexpressão no CP em relação ao controle na coorte do TCGA (Figura 14D,  $p < 0,01$ ). Na coorte clínica não conseguimos detectar nenhuma expressão de TRF1 (Figura 14I).

Em relação ao prognóstico, não foi possível realizar nenhuma associação na coorte clínica, mas, na coorte do TCGA vemos que a superexpressão de TRF1 está associado com a pior sobrevida global (Figura 14E,  $p = 0,028$ ) e sobrevida livre de doença (Figura 14F,  $p = 0,023$ ). Nós também correlacionamos a expressão de TRF1 com a expressão do RA. O RA foi escolhido por sua associação com a progressão do CP e a manutenção dos telômeros no câncer (116, 118, 131, 132). A expressão de TRF1 teve uma correlação positiva forte com RA no tecido maligno (Figura 14G,  $r = 0,7$ ,  $p < 0,001$ ), mas não no tecido normal (Figura 14H,  $r = -0,023$ ).

Para melhor explorar a ausência de expressão de TRF1 na coorte clínica estudamos a expressão do microRNA 155 (miR-155) em nossas amostras. O miR-155 é o único microRNA identificado na literatura como inibidor da expressão gênica de TRF1 e já foi associado à desregulação desse gene em amostras de câncer de mama e próstata (133, 134). Observamos que o miR-155 está superexpresso nas amostras clínicas de CP (Figura 14J,  $p = 0,0348$ ), o que poderia explicar esse fenômeno. Vale ressaltar que este microRNA também é superexpresso na coorte do TCGA (dados não mostrados).



**Figura 14.** Envolvimento de TRF1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B e C temos como as alterações genéticas impactam na sobrevivida global do CP localizado e CPRC respectivamente. Em D a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em F temos a curva de sobrevivida global de amostras na coorte do TCGA. Em G temos a curva de sobrevivida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em G e H temos a correlação entre a expressão do RA e TRF1 no CP e controle respectivamente, na coorte do TCGA. Em I temos a expressão de TRF1 na comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em J temos a expressão do miR-155 na comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em K temos a expressão de TRF1 nas linhagens celulares. Em L temos a expressão de miR-155 nas linhagens celulares. \*  $\text{Log}_2\text{FC}$  Cutoff: 0,15  $p < 0,01$ .

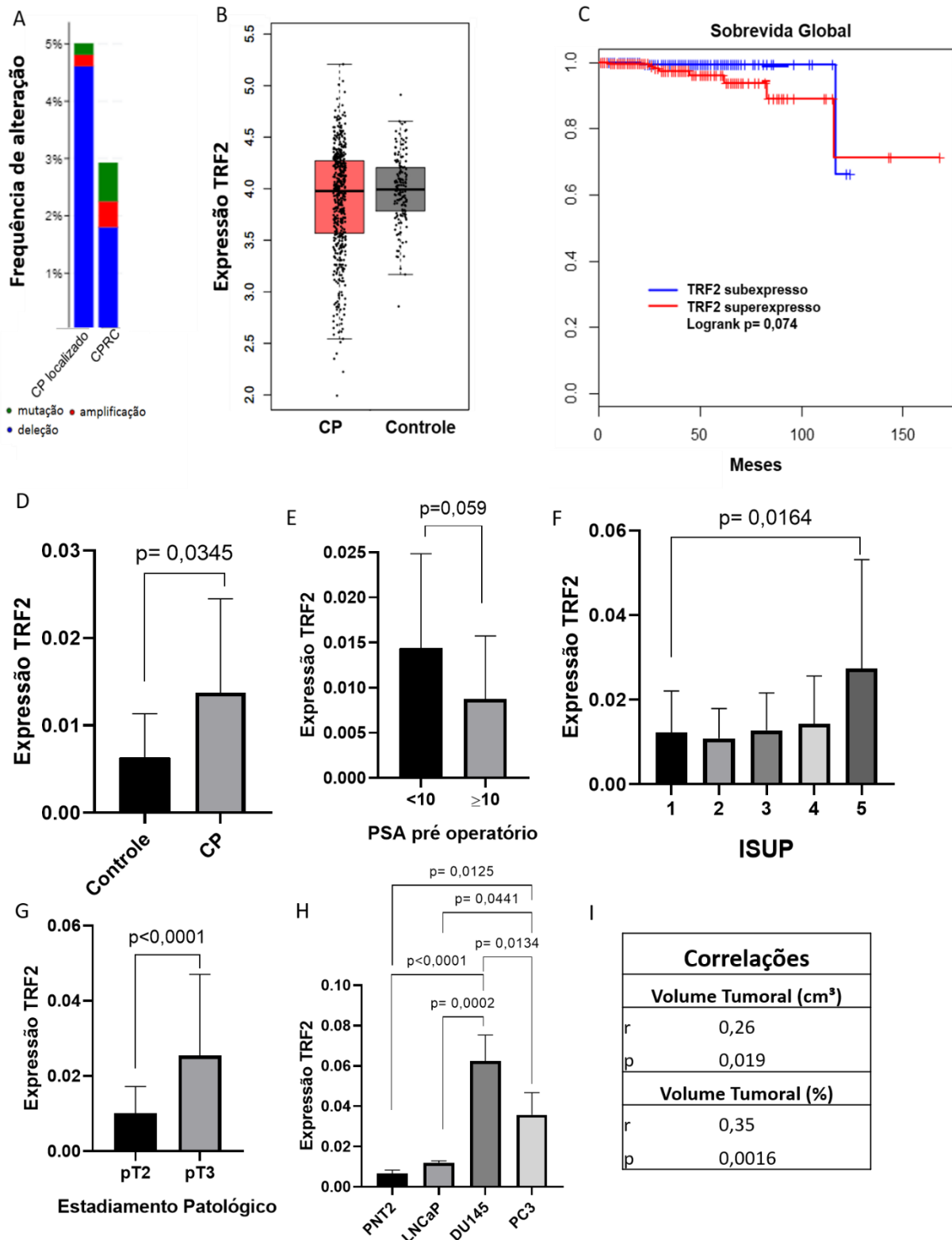
Finalmente, nas linhagens celulares observamos uma diminuição na expressão de TRF1 progressiva da LNCaP para a PC3 (Figura 14K,  $p= 0,0242$ ). Por questões técnicas não conseguimos comparar a expressão de miR-155 da PNT2 com as linhagens de CP. Apesar disso, quando estudamos a expressão do miR-155 não observamos diferenças significativas entre as linhagens celulares de CP (Figura 14L), sugerindo outro mecanismo de controle de TRF1.

#### 4.1.3 TRF2

A figura 15A nos mostra que pouco menos de 5% dos tumores localizados tem alterações genéticas em TRF2, a grande maioria delas sendo deleções. Na coorte do CPRC, cerca de 3% das amostras apresentam alterações, com uma diminuição na proporção de deleções e um leve aumento na proporção de mutações e ampliações em relação à coorte do CP localizado, porém sem diferenças significativas.

Não verificamos diferenças significativas na expressão de TRF2 na coorte do TCGA (Figura 15B), mas observamos uma superexpressão significativa na coorte clínica (Figura 15D,  $p= 0,0345$ ). Em relação ao prognóstico, temos resultados contrastantes. Na coorte do TCGA verificamos que a superexpressão do TRF2 apresenta uma tendência de piora na sobrevida global (Figura 15C,  $p= 0,074$ ). Já na coorte clínica, o aumento de TRF2 está associado marginalmente com níveis de PSA menores que 10 (Figura 15E,  $p= 0,059$ ). Por outro lado, o aumento da expressão gênica de TRF2 se associa significativamente com o escore de ISUP 5 (Figura 15F,  $p= 0,0164$ ) e com tumores pT3 (Figura 15G,  $p < 0,0001$ ). Finalmente, verificamos uma correlação positiva entre os níveis de expressão de TRF2 e o volume tumoral tanto em  $\text{cm}^3$  quanto em porcentagem da próstata acometida pela doença (Figura 15I  $r= 0,26$   $p= 0,019$  e  $r= 0,35$   $p= 0,0016$ , respectivamente).

Nas linhagens celulares observamos uma superexpressão de TRF2 nos modelos de CPRC (Figura 15H). Existe um aumento significativo em TRF2 na PC3 em relação à LNCaP e PNT2 ( $p= 0,0441$  e  $p= 0,0125$ , respectivamente) e na DU145 em relação a PC3, LNCaP e PNT2 ( $p= 0,0134$ ,  $p= 0,0002$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente).



**Figura 15.** Envolvimento de TRF2 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevivência global de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E, F e G temos a relação da expressão de TRF2 com os fatores prognóstico (PSA, ISUP e estadiamento patológico, respectivamente). Em H temos a expressão de TRF2 nas linhagens celulares. Em I temos as correlações entre níveis de expressão e volume tumoral (em porcentagem e cm<sup>3</sup>).

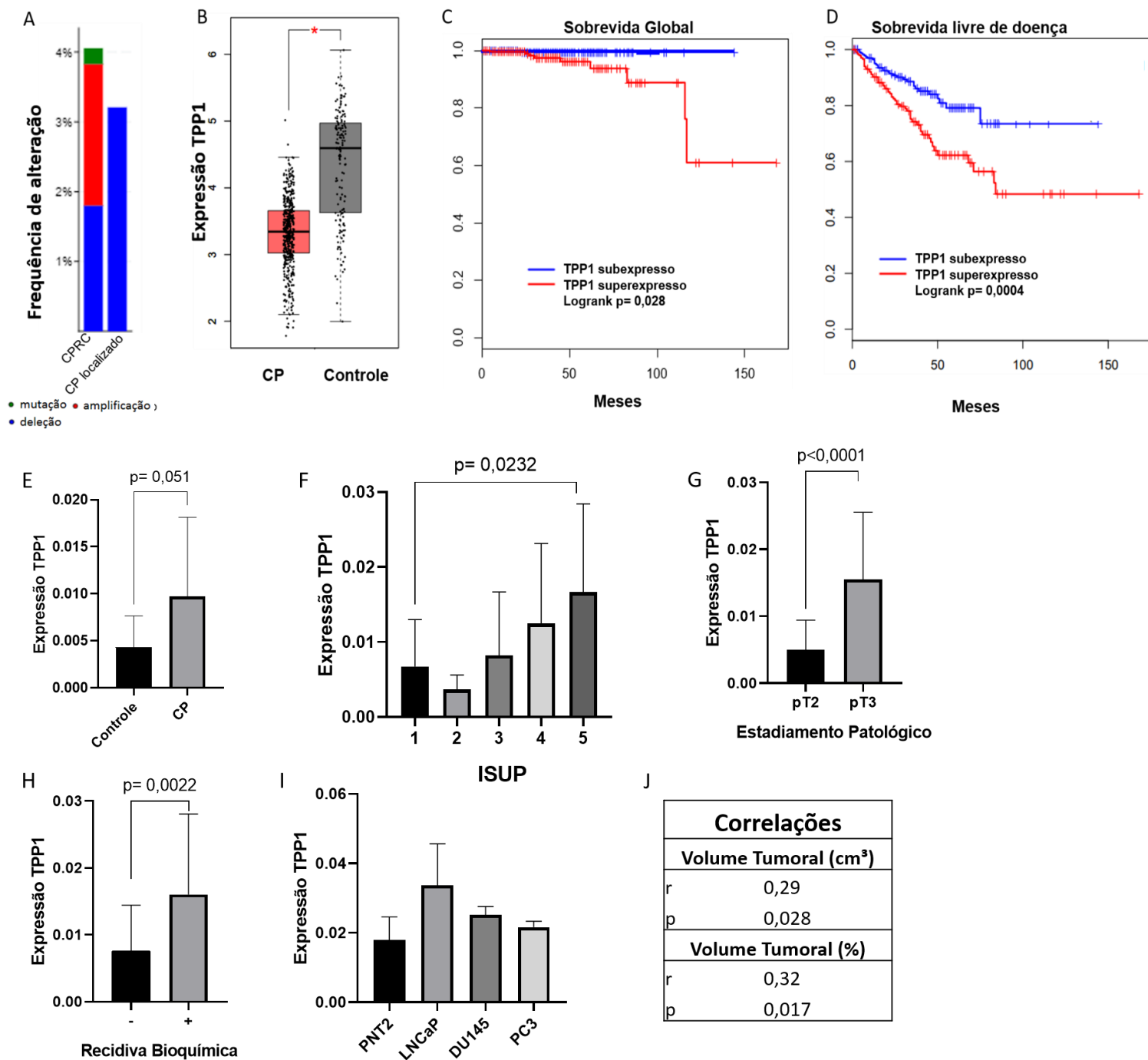
#### 4.1.4 TPP1

Na figura 16A vemos que pouco mais de 3% das amostras de câncer localizado apresentam deleções em TPP1, sem a presença de amplificações e/ou mutações. Na coorte do CPRC, vemos que pouco mais de 4% das amostras apresentam alguma alteração em TPP1. Apesar de uma análise de contingência não demonstrar diferença estatística entre as duas coortes, nas amostras de CPRC, temos alguns casos de mutações e uma proporção relativamente grande (aproximadamente metade de todas as alterações) de amplificações.

Em relação à comparação do câncer com o tecido controle, temos resultados diferentes: na coorte do TCGA, vemos uma subexpressão de TPP1 no tecido maligno (Figura 16B,  $p < 0,01$ ) e na coorte clínica vemos uma superexpressão com significância estatística marginal de TPP1 (Figura 16E,  $p = 0,051$ ).

Em relação ao prognóstico, temos que o aumento da expressão de TPP1 está relacionado a pior sobrevida global (Figura 16C,  $p = 0,028$ ) e a pior sobrevida livre de doença (Figura 16D,  $p = 0,0004$ ) na coorte do TCGA. Na coorte clínica, a superexpressão de TPP1, está associada ao pior escore de ISUP (Figura 16F,  $p = 0,0232$ ), tumores pT3 (Figura 16G,  $p < 0,0001$ ) e à recidiva bioquímica (Figura 16H,  $p = 0,0022$ ). Ainda temos correlações positivas entre a expressão de TPP1 e o volume tumoral tanto em  $\text{cm}^3$  quanto em porcentagem da próstata acometida pelo câncer (Figura 16J  $r = 0,29$   $p = 0,028$  e  $r = 0,32$   $p = 0,017$  respectivamente).

Finalmente, nas linhagens celulares não temos diferenças significativas na expressão de TPP1, apesar de termos uma superexpressão nas amostras de CP, sobretudo na LNCaP (Figura 16I).



**Figura 16.** Envolvimento de TPP1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida global de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em E temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em F, G e H temos a relação da expressão de TPP1 com fatores prognósticos (ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em I temos a expressão de TPP1 nas linhagens celulares. Em J temos as correlações entre níveis de expressão e volume tumoral (em porcentagem e cm<sup>3</sup>). \* Log<sub>2</sub>FC Cutoff: 0,5 p<0,01.

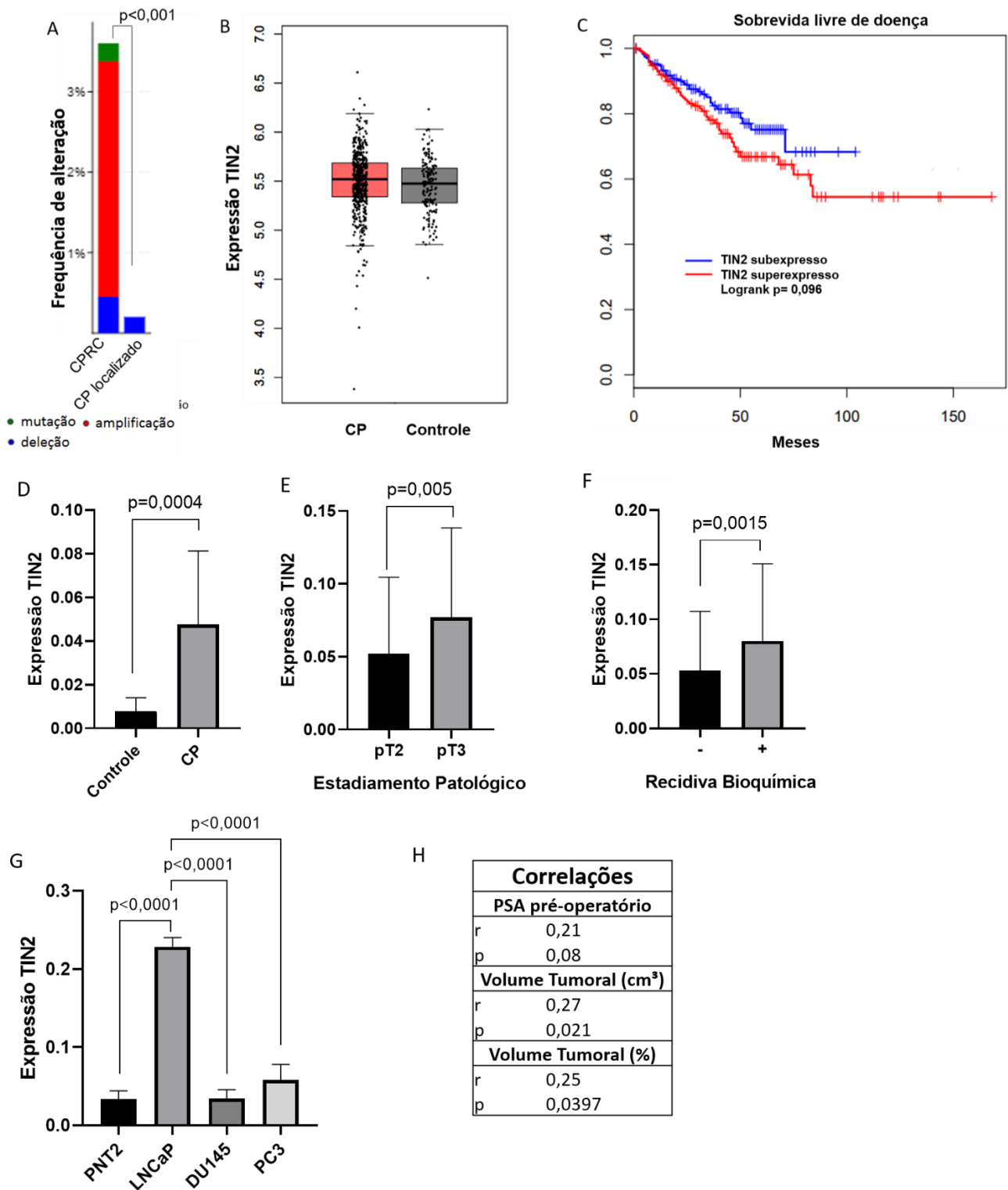
#### 4.1.5 *TIN2*

Vemos que menos de 0,5% das amostras de câncer localizado apresentam deleções em *TIN2*, enquanto no CPRC temos um aumento significativo de alterações, com cerca de 3,5% das amostras alteradas, a maioria delas sendo amplificações (Figura 17A,  $p < 0,0001$ ).

Assim como nos resultados da *TPP1*, temos dados contrastantes na comparação entre CP e controle. Na coorte do TCGA (Figura 17B) não verificamos diferenças entre na expressão de *TIN2*. Na coorte clínica observamos que este gene está superexpresso no CP (Figura 17D,  $p = 0,0004$ ). Os prováveis motivos para essa diferença serão comentados na discussão.

Em relação ao prognóstico vemos uma tendência que os tumores com pior sobrevida livre de doença superexpressam *TIN2* na coorte do TCGA (Figura 17C,  $p = 0,098$ ). Na coorte clínica, observamos que a maior expressão de *TIN2* em tumores que não estão confinados a próstata (Figura 17E,  $p = 0,005$ ) e que tiveram recidiva bioquímica após tratamento (Figura 17F  $p = 0,0015$ ). Temos ainda correlações significativas entre a expressão gênica e o volume tumoral tanto em  $\text{cm}^3$  quanto em porcentagem da próstata acometida pelo câncer (Figura 17H  $r = 0,27$   $p = 0,021$  e  $r = 0,25$   $p = 0,0397$  respectivamente). Finalmente observamos uma correlação marginal entre a expressão de *TIN2* e os níveis de PSA pré-operatório (Figura 17H,  $r = 0,21$   $p = 0,08$ )

Nas linhagens celulares vemos uma grande expressão de *TIN2* na LNCaP em relação a *PNT2* e os modelos de CPRC (Figura 17G,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 17.** Envolvimento de TIN2 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E e F temos a relação da expressão de TIN2 com fatores prognósticos, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em G temos a expressão de TIN2 nas linhagens celulares. Em H temos as correlações entre níveis de expressão e PSA pré-operatório e volume tumoral (em porcentagem e cm<sup>3</sup>), respectivamente.



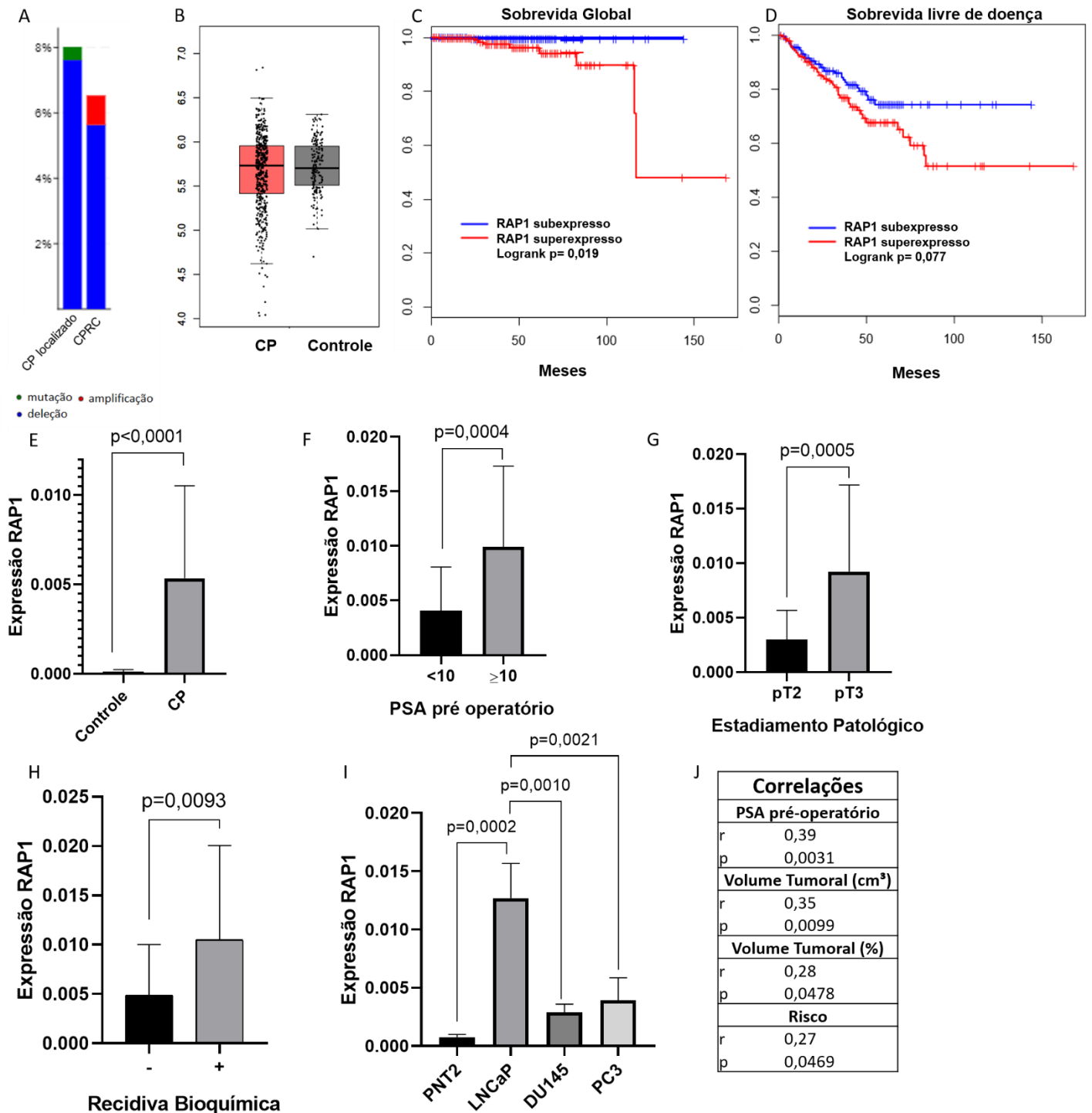
#### 4.1.6 *RAP1*

Vemos que as alterações genéticas em *RAP1* têm frequência parecidas nos CP localizado (cerca de 8%) e CPRC (pouco mais de 6%) e a maioria delas são do tipo deleções (Figura 18A). Apesar disso, o CP localizado apresenta algumas mutações enquanto o CPRC apresenta algumas amplificações, sem diferenças estatísticas entre as duas populações.

Em relação à expressão gênica no tecido tumoral, temos um fenômeno parecido com o da expressão de *TIN2*: não temos diferença na expressão entre CP e controle na coorte do TCGA (Figura 18B), mas temos uma superexpressão na coorte clínica (Figura 18E,  $p < 0,0001$ ).

Observamos também que o aumento da expressão de *RAP1* está associado ao pior prognóstico em ambas as casuísticas. Na coorte do TCGA, tumores que superexpressam *RAP1* tem pior sobrevida global (Figura 18C,  $p = 0,019$ ) e uma tendência a pior sobrevida livre de doença (Figura 18D,  $p = 0,077$ ). Na coorte clínica, temos que a menor expressão de *RAP1* está associada a pacientes com PSA menor que 10ng/ml (Figura 18F,  $p = 0,0004$ ), à tumores confinados a próstata (Figura 18G,  $p = 0,0005$ ) e à ausência de recidiva bioquímica (Figura 18H  $p = 0,0093$ ). Além disso, é possível fazer uma correlação positiva entre a expressão de *RAP1* e os níveis de PSA sérico, ao volume tumoral e ao risco da doença (Figura 18J,  $r = 0,39$   $p = 0,0031$ ;  $r = 0,35$   $p = 0,0099$ ;  $r = 0,28$   $p = 0,0478$ ;  $r = 0,27$   $p = 0,0469$ , respectivamente).

Nas linhagens celulares, temos novamente um fenômeno semelhante à expressão de *TIN2*: vemos a superexpressão de *RAP1* na LNCaP em relação as outras três linhagens celulares (Figura 18G). Apesar disso, quando comparamos a PNT2 somente com a DU145 e PC3 vemos uma superexpressão significativa nas linhagens de CPRC (dados não mostrados), o que indica que de fato há um aumento de *RAP1* nas células malignas.



**Figura 18.** Envolvimento de RAP1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevivência global de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a curva de sobrevivência livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em E temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em F, G e H temos a relação da expressão de RAP1 com fatores prognósticos (PSA, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em I temos a expressão de RAP1 nas linhagens celulares. Em J temos as correlações entre níveis de expressão e PSA pré-operatório, volume tumoral (em porcentagem e cm<sup>3</sup>) e risco do câncer, respectivamente.

## 4.2 Telomerase

### 4.2.1 TERT

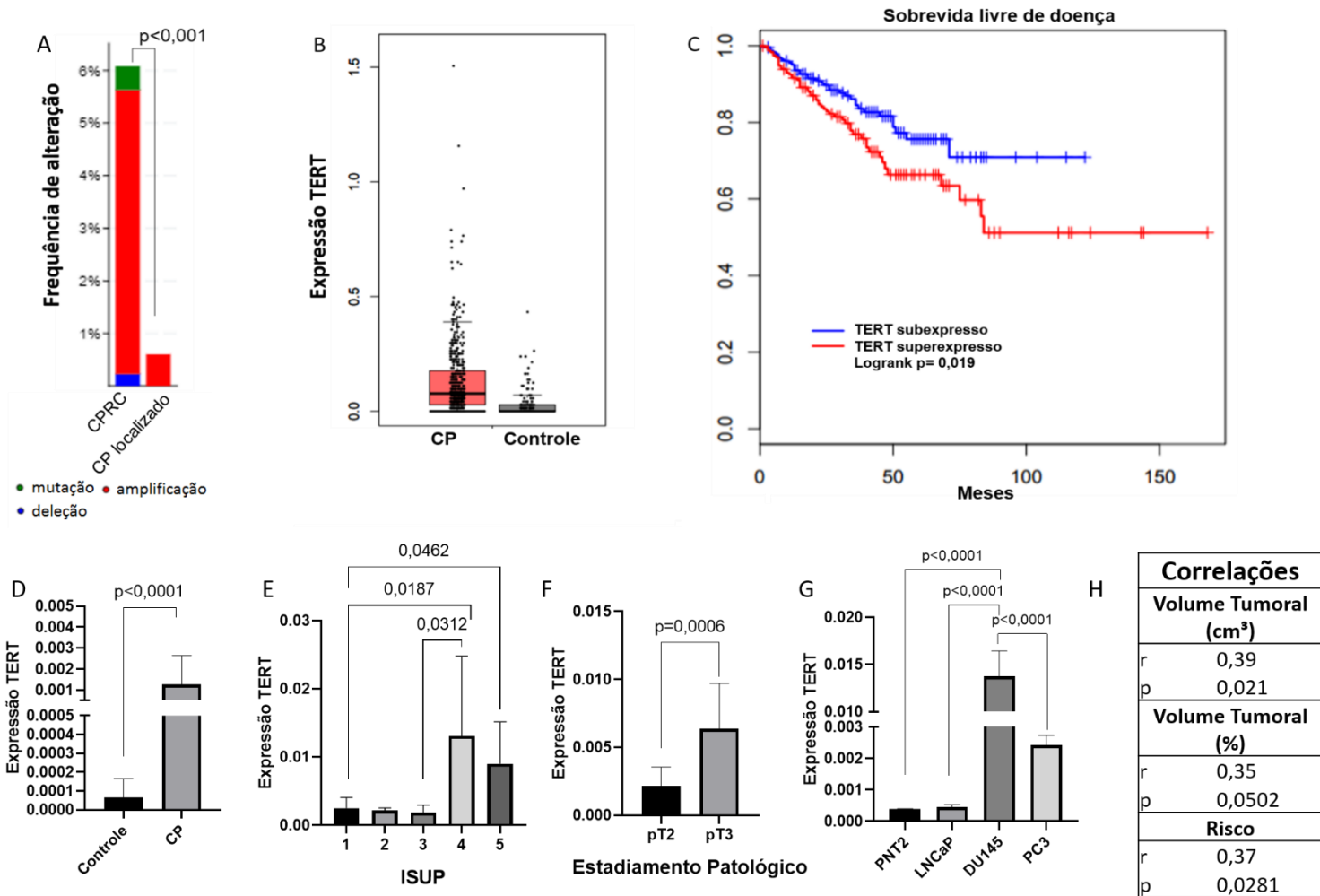
Na figura 19A observamos que o CP localizado apresenta menos de 1% de alterações no gene da TERT, todas elas do tipo amplificação. No CPRC temos um aumento no número de alterações, com cerca de 6% das amostras alteradas, com uma pequena presença de mutações e deleções e um grande aumento no número de ampliações, o que faz as duas populações diferirem estatisticamente ( $p < 0,001$ ).

Em relação à expressão, vemos que a TERT está superexpressa no CP em relação ao controle na coorte do TCGA (Figura 19B, sem significância estatística) e na coorte clínica (Figura 19D,  $p < 0,0001$ ).

Vemos também que a superexpressão da TERT está associada a pior sobrevida livre de doença na coorte do TCGA (Figura 19C,  $p = 0,0019$ ). Na coorte clínica, a baixa expressão da TERT é um fator protetivo em relação ao ISUP (figura 19E) e ao estadiamento patológico (Figura 19F,  $p = 0,0006$ ). Temos ainda correlações positivas entre a expressão deste gene com o volume tumoral (em  $\text{cm}^3$  e porcentagem da próstata acometida pela doença) e com o risco do câncer (Figura 19H,  $r = 0,39$   $p = 0,021$ ;  $r = 0,35$   $p = 0,0502$ ;  $r = 0,37$   $p = 0,0281$ , respectivamente).

No caso específico da TERT, a detecção deste gene é problemática como será relatado em detalhes na discussão. Então para confirmar o papel prognóstico realizamos análises de contingência entre a expressão gênica e a detecção (ou não) da expressão. Como observamos na figura 19I, a detecção de TERT se concentra em tumores com pior prognóstico em relação a escore de ISUP ( $p = 0,031$ ), estadiamento patológico ( $p = 0,0009$ ), recidiva bioquímica ( $p = 0,01$ ) e risco do câncer ( $p = 0,0015$ ).

Finalmente, na figura 19G vemos que a expressão de TERT se encontra muito alta na linhagem celular DU145 em relação a todas as outras ( $p < 0,0001$ ). Aqui é importante destacar que quando comparamos a expressão de TERT na PC3 diretamente com a PNT2 e a LNCaP (sem a presença da DU145), ela também se encontra significativamente superexpressa, o que indica que a concentração desse gene também é maior nessa linhagem celular (dados não mostrados).



**Análise de contingência**

	ISUP						Estadiamento Patológico			Recidiva Bioquímica			Risco		
	1	2	3	4	5	p	pT2	pT3	p	-	+	p	Alto	Baixo ou Intermediário	p
Expressa	7	2	3	12	11	0,031	15	20	0,0009	17	12	0,01	26	9	0,0015
Não Expressa	20	3	9	6	8		37	9		35	5		17	29	

**Figura 19.** Envolvimento de TERT no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E e F temos a relação da expressão de TERT com fatores prognósticos (ISUP e estadiamento patológico, respectivamente). Em G temos a expressão de TERT nas linhagens celulares. Em H temos as correlações entre níveis de expressão e volume tumoral (em porcentagem e cm³) e com o risco do câncer, respectivamente. Em I temos as análises de contingência sobre a ausência ou presença de expressão e fatores prognósticos (ISUP, estadiamento patológico, recidiva bioquímica e risco do câncer, respectivamente).

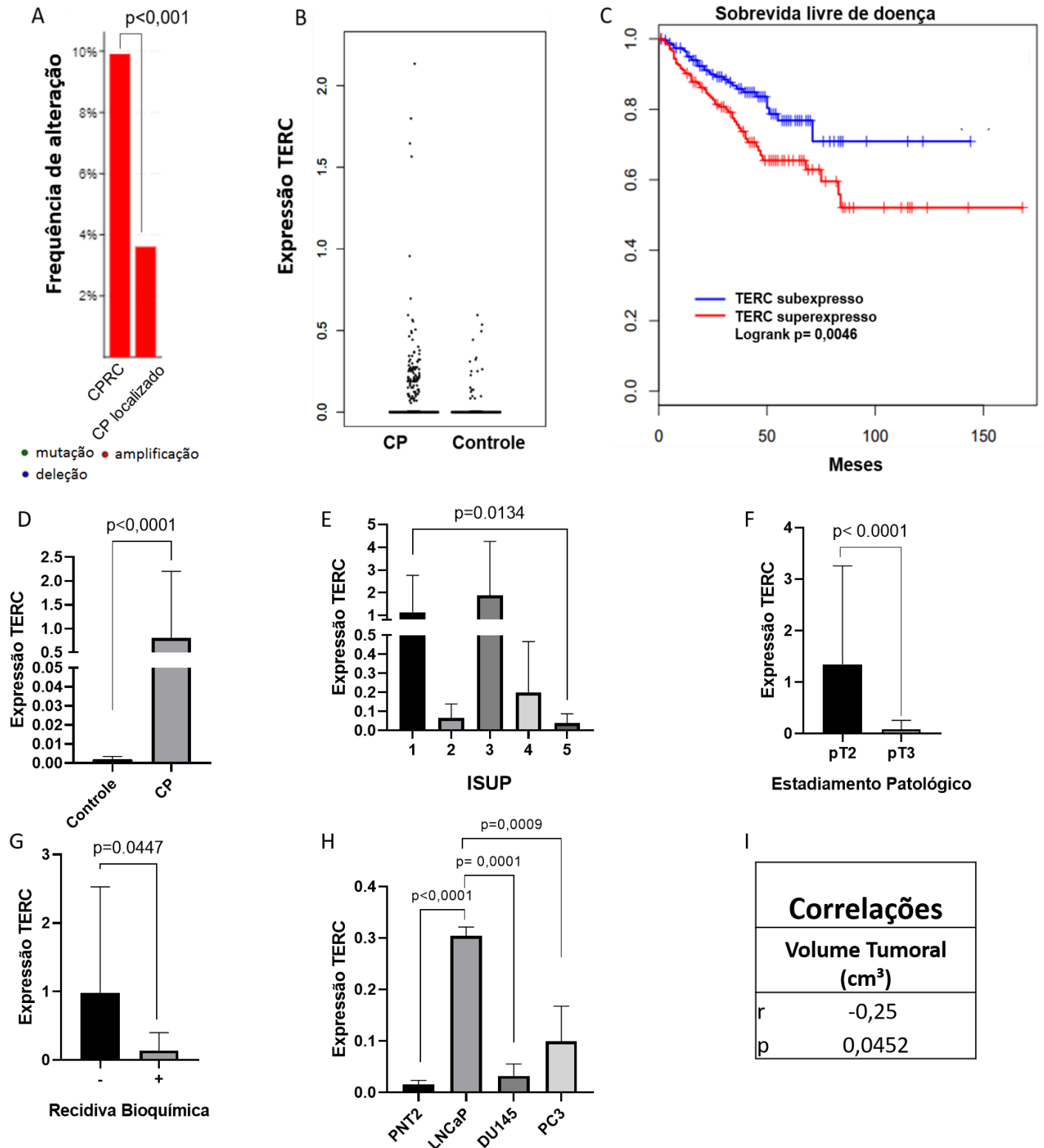
#### 4.2.2 TERC

Na figura 20A vemos que em ambas as coortes, a única alteração genética de TERC são do tipo amplificação. As amostras do CP localizado têm cerca de 4% de amplificações e há um enriquecimento dessa alteração no CPRC, com cerca de 10% de tumores alterados ( $p < 0,001$ ).

Quanto à expressão, vemos que a TERC não apresenta diferença entre CP e controle na coorte do TCGA (Figura 20B) e está superexpressa na coorte clínica (Figura 20D,  $p < 0,0001$ ).

A superexpressão de TERC está relacionada com a pior sobrevida livre de doença na coorte do TCGA (Figura 20C,  $p = 0,0046$ ). Por outro lado, na coorte clínica, a menor expressão da TERC se correlaciona com o pior prognóstico. Observamos a alta expressão de TERC em tumores ISUP 1 (Figura 20E,  $p = 0,0134$ ), confinados a próstata (Figura 20F,  $p < 0,0001$ ) e que não recidivaram (Figura 20G,  $p = 0,0447$ ). Além disso temos uma correlação negativa entre volume tumoral e expressão deste RNA (Figura 20I,  $r = -0,25$   $p = 0,0452$ )

Nas linhagens celulares, temos um fenômeno interessante: a expressão de TERC está aumentada somente na LNCaP em relação a PNT2, DU145 e PC3 (Figura 20F,  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0001$  e  $p = 0,0009$  respectivamente).



**Figura 20.** Envolvimento de TERC no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E, F e G temos a relação da expressão de TERC com fatores prognósticos (ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica respectivamente). Em H temos a expressão de TERC nas linhagens celulares. Em I temos a correlação entre níveis de expressão e volume tumoral (em cm<sup>3</sup>).

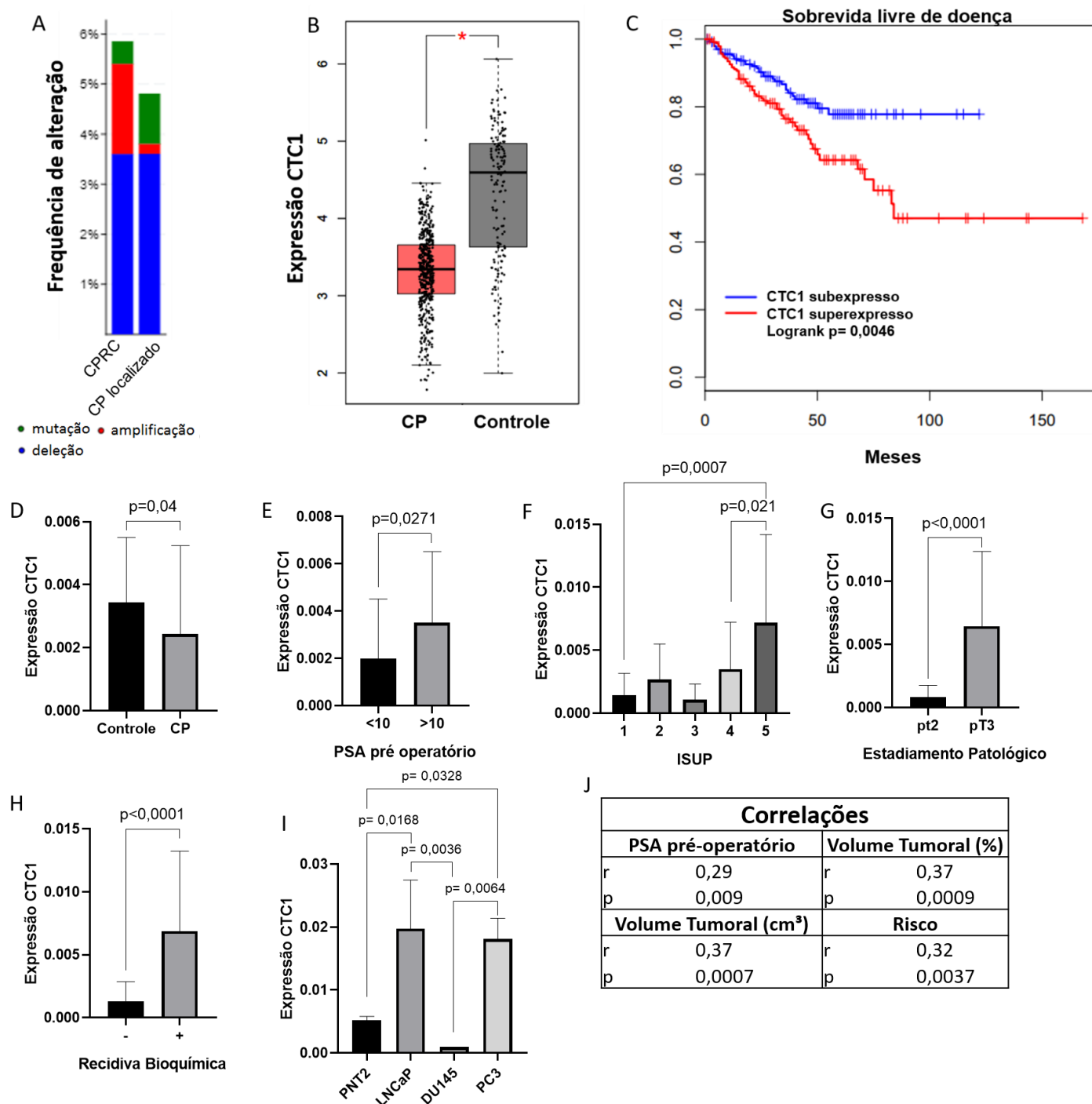
### 4.3 Complexo CST

#### 4.3.1 CTC1

Na figura 21A vemos que ambas as casuísticas apresentam proporções próximas de alterações genéticas em CTC1, com pouco menos de 5% no CP localizado e cerca de 6% no CPRC. A proporção de deleções é a mesma, porém há um aumento no número de amplificações e uma diminuição no número de mutações no CPRC, não o suficiente para as duas coortes diferirem estatisticamente.

CTC1 se encontra subexpresso no CP em relação ao controle na coorte do TCGA (Figura 21B,  $p < 0,001$ ) e na coorte clínica (Figura 21D,  $p = 0,04$ ). Por outro lado, a superexpressão de CTC1 se associa ao pior prognóstico em ambas as casuísticas. Na coorte do TCGA o aumento de CTC1 se associa com associada à pior sobrevida livre de doença na coorte do TCGA (Figura 21C,  $p = 0,0046$ ). Na coorte clínica observamos que o aumento de CTC1 se associa, respectivamente, com: níveis de PSA acima de 10 ng/ml (Figura 21E,  $p = 0,02710$ ), tumores ISUP 5 (Figura 21F), doença não confinada à próstata (Figura 21G,  $p < 0,0001$ ) e a recidiva bioquímica (Figura 21H,  $p < 0,0001$ ). Temos ainda na figura 21J correlações positivas entre a expressão gênica e PSA pré-operatório ( $r = 0,29$   $p = 0,009$ ), volume tumoral (em  $\text{cm}^3$  e porcentagem da próstata acometida pela doença) ( $r = 0,37$   $p = 0,0008$ ;  $r = 0,37$   $p = 0,0009$ , respectivamente) e ao risco do câncer ( $r = 0,32$   $p = 0,0037$ )

Na figura 21I vemos que CTC1 está superexpresso na LNCaP e na PC3 em relação a PNT2 ( $p = 0,0168$  e  $p = 0,0328$ , respectivamente) e DU145 ( $p = 0,0036$  e  $p = 0,0064$ , respectivamente). Ainda é possível notar uma subexpressão significativa na DU145 em relação a PNT2 quando comparamos as duas linhagens celulares isoladamente, indicando a baixa expressão desse gene na linhagem metastática (dados não mostrados).



**Figura 21.** Envolvimento de CTC1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E, F, G e H temos a relação da expressão de CTC1 com fatores prognósticos (PSA, ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica respectivamente). Em I temos a expressão de CTC1 nas linhagens celulares. Em J temos as correlações entre níveis de expressão e PSA pré-operatório, volume tumoral (em cm<sup>3</sup> e porcentagem) e risco do câncer. \* Log<sub>2</sub>FC Cutoff: 1 p<0,01.



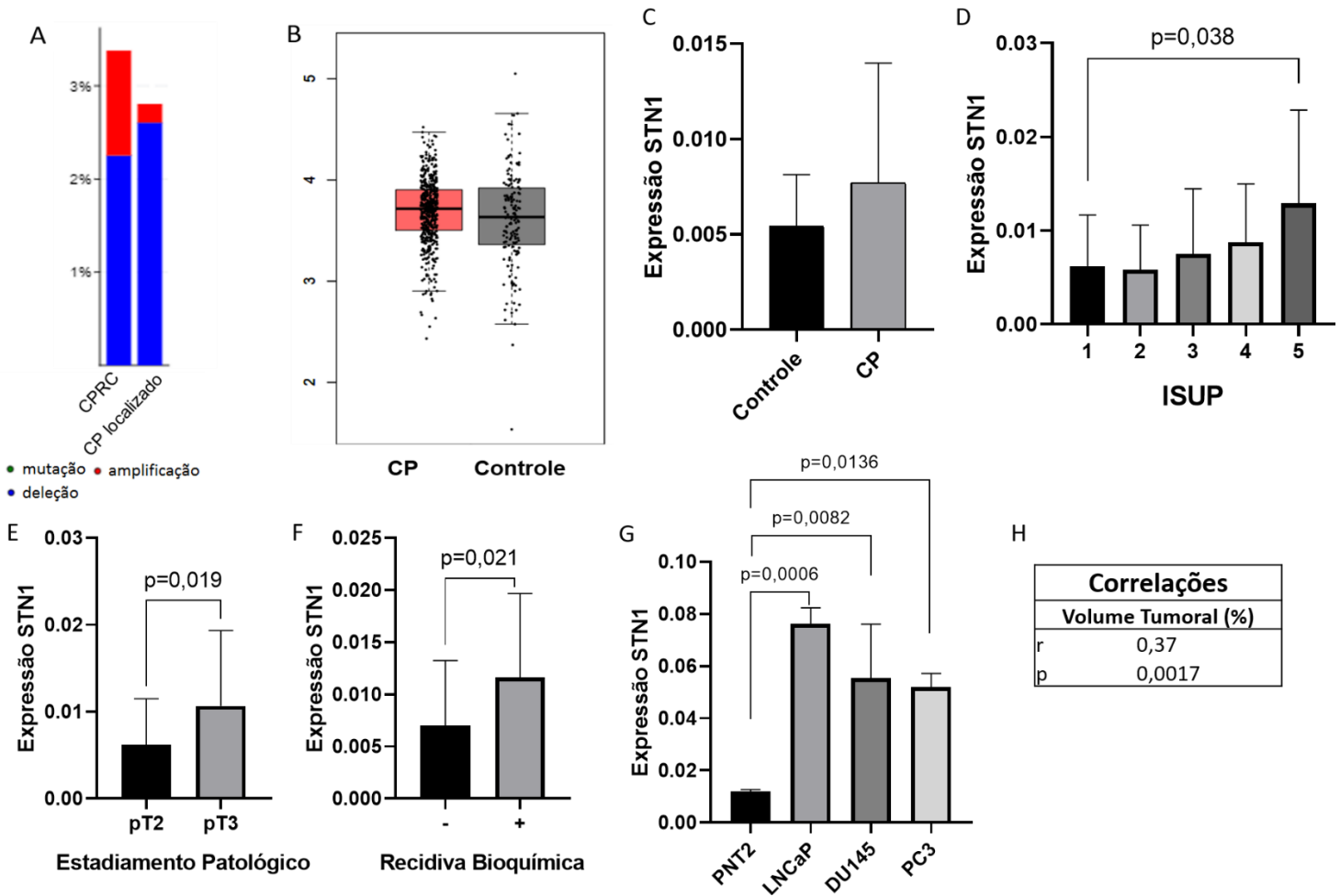
#### 4.3.2 *STN1*

Na figura 22A observamos que a proporção de alterações em *STN1* entre o CP localizado (pouco menos de 3%) e o CPRC é semelhante (cerca de 3,5%). Temos ainda um aumento no número de ampliações e uma diminuição no número de deleções no CPRC, sem diferença significativa entre as duas populações.

Em relação a sua expressão, vemos uma superexpressão bastante discreta no CP em relação ao controle, porém, sem significância estatística, tanto na coorte do TCGA (Figura 22B) quanto na coorte clínica (Figura 22C).

Em relação ao prognóstico, só obtivemos resultados significativos na coorte clínica. Vemos que o aumento de *STN1* se associa com o pior prognóstico em relação ao escore e ISUP (Figura 22D,  $p=0,038$ ), estadiamento patológico (Figura 22E,  $p=0,019$ ), recidiva bioquímica (Figura 22G,  $p=0,021$ ) e volume tumoral em porcentagem (Figura 22H,  $r=0,37$   $p=0,0017$ ).

Na figura 22G vemos que *STN1* está subexpressa na linhagem prostática normal em relação a LNCaP ( $p=0,0006$ ), DU145 ( $p=0,0082$ ) e PC3 ( $p=0,0136$ ), indicando que esse gene está superexpresso no CP metastático. Ainda, quando comparamos diretamente a LNCaP com a PC3 observamos que *STN1* se encontra significativamente subexpressa na linhagem de CPRC (dados não mostrados).



**Figura 22.** Envolvimento de STN1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em D, E e F temos a relação da expressão de STN1 com fatores prognósticos (ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica respectivamente). Em G temos a expressão de STN1 nas linhagens celulares. Em H temos a correlação entre níveis de expressão, volume tumoral (em porcentagem).

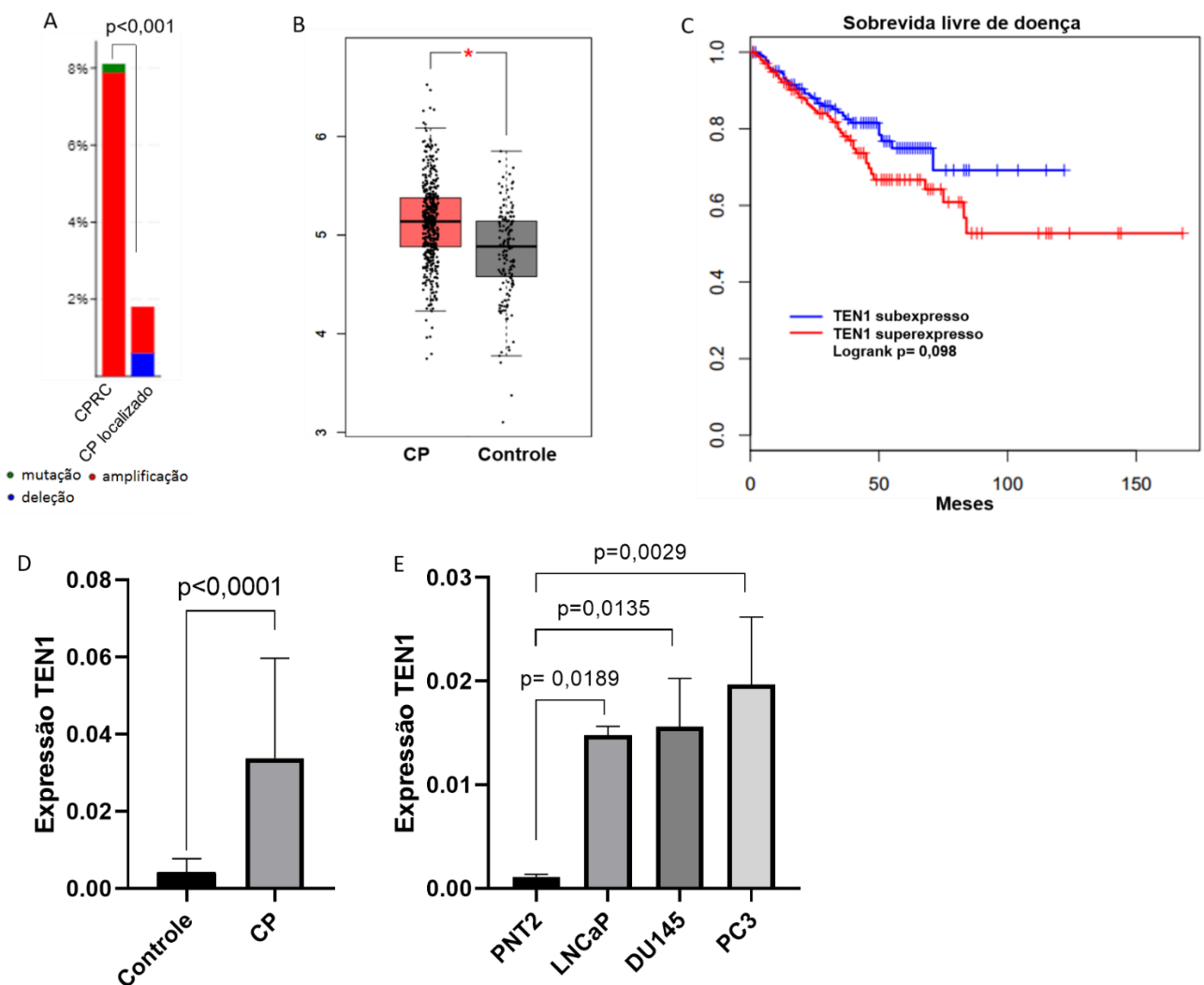
#### 4.3.3 *TEN1*

Na figura 23A, vemos que cerca de 2% das amostras de CP localizado possuem alguma alteração em *TEN1*. Na coorte do CIRC temos cerca de 8% das amostras alteradas. No CIRC temos um enriquecimento no número de amplificações, a presença de algumas mutações e a ausência de deleções, que estão presente em pequena proporção no CP localizado ( $p < 0,001$ ).

Observamos uma superexpressão significativa de *TEN1* tanto na coorte do TCGA (Figura 23B,  $p < 0,01$ ) quanto na coorte clínica (Figura 23D,  $p < 0,0001$ ). Temos uma

tendência de associação entre o aumento da expressão gênica de TEN1 e a pior sobrevida livre de doença na coorte do TCGA (Figura 23C,  $p=0,098$ ). Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a expressão de TEN1 e os fatores prognósticos estudados na coorte clínica (dados não mostrados).

Finalmente, na figura 23E verificamos que TEN1 se encontra subexpresso no epitélio prostático normal em relação à LNCaP ( $p=0,0189$ ), DU145 ( $p=0,0135$ ) e PC3 ( $p=0,0029$ ) indicando que esse gene está superexpresso no CP metastático. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as três linhagens celulares de CP metastático.

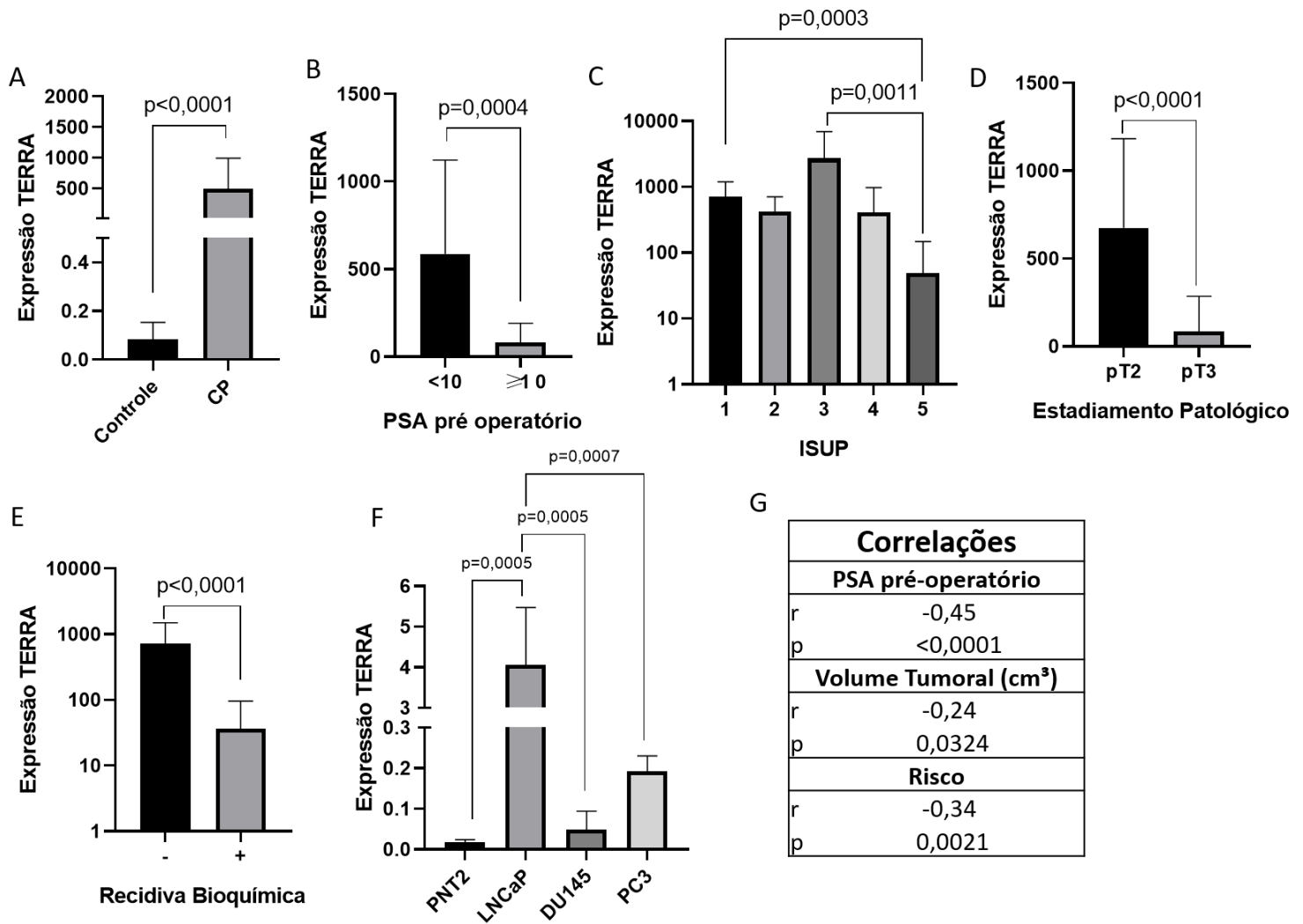


**Figura 23.** Envolvimento de TEN1 no câncer de próstata. Em A temos as alterações genômicas e suas frequências em cada estágio tumoral. Em B temos a comparação de expressão do tecido maligno com o normal na coorte do TCGA. Em C temos a curva de sobrevida livre de doença de amostras na coorte do TCGA. Em D temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em E temos a expressão de CTC1 nas linhagens celulares. \*  $\text{Log}_2\text{FC}$  Cutoff: 0,25  $p < 0,01$ .

#### 4.4 TERRA

Observamos que a expressão de TERRA está bastante aumentada no CP em relação ao controle na coorte clínica (Figura 24A,  $p < 0,0001$ ). Apesar disso, observamos uma menor expressão de TERRA nos pacientes com PSA pré-operatório acima de 10 ng/ml (Figura 24B,  $p = 0,0004$ ), escore de ISUP 5 (Figura 24C), tumores não-confinados (Figura 24D,  $p < 0,0001$ ) e com recidiva bioquímica (Figura 24E,  $p < 0,0001$ ). Na figura 24G temos correlações negativas entre os níveis de expressão de TERRA e PSA sérico ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,0001$ ), volume tumoral em  $\text{cm}^3$  ( $r = -0,24$   $p = 0,0324$ ) e rcos do câncer ( $r = -0,34$   $p = 0,0021$ ).

Nas linhagens celulares vemos uma superexpressão de TERRA da LNCaP em relação a PNT2 ( $p = 0,0005$ ), DU145 ( $p = 0,0005$ ) e PC3 ( $p = 0,0007$ ) (Figura 24C). Adicionalmente, quando fazemos uma comparação sem a LNCaP na análise, temos uma superexpressão significativa na PC3 em relação a PNT2 e DU145 (dados não mostrados), indicando que TERRA está superexpresso também nessa linhagem celular.



**Figura 24.** Envolvimento de TERRA no câncer de próstata. Em A temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em B, C, D e E temos a relação da expressão de TERRA com fatores prognósticos (PSA, ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em F temos a expressão de TERRA nas linhagens celulares. Em G temos as correlações entre níveis de expressão e PSA pré-operatório, volume tumoral (em cm<sup>3</sup>) e risco do câncer.

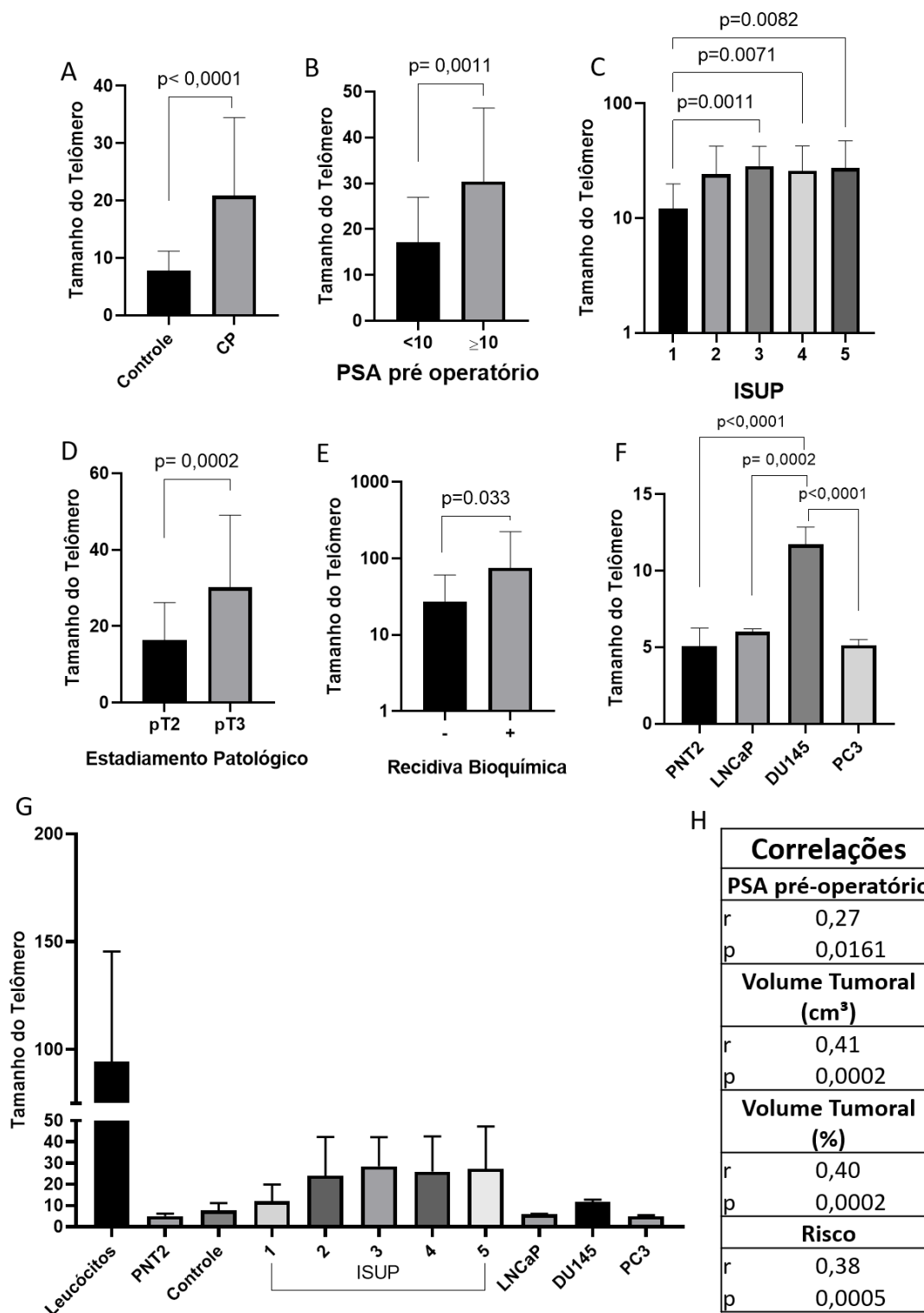
#### 4.5 Tamanho do Telômero

Observamos que os telômeros do CP são maiores do que os telômeros do grupo controle (Figura 25A,  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, o maior tamanho telomérico se associa com pacientes que tinham PSA sério acima de 10 ng/ml (Figura 25B,  $p = 0,0011$ ), com maiores escore de ISUP (Figura 25C), com tumores pT3 (Figura 25D,  $p = 0,0002$ ) e com recidiva bioquímica (Figura 25E,  $p = 0,033$ ).

Na figura 25H verificamos correlações positivas entre o tamanho do telômero e classificação o PSA sérico ( $r= 0,27$   $p= 0,0161$ ), volume tumoral em  $\text{cm}^3$  ( $r= 0,41$   $p= 0,0002$ ), volume tumoral em porcentagem ( $r=0,30$   $p= 0,0002$ ) e com o risco do CP ( $r= 0,38$ ,  $p= 0,0005$ ).

Nas linhagens celulares observamos que o tamanho médio dos telômeros (Figura 25D) é significativamente maior na DU145 em comparação com a PNT2 ( $p<0,0001$ ), LNCaP ( $p= 0,0002$ ) e PC3 ( $p<0,0001$ ). Ainda, quando comparamos a LNCaP diretamente com a PC3, vemos que os telômeros da linhagem celular de CPRC é significativamente menor do que da linhagem sensível a castração (dados não mostrados).

Na figura 25G ilustramos os telômeros de todas as nossas amostras de próstata com os telômeros de leucócitos de pacientes saudáveis. Aqui, dividimos as amostras de CP localizado de acordo com seu grau de ISUP. Além disso, é importante lembrar que o grupo controle da coorte clínica corresponde a amostras teciduais de HPB. Finalmente, o grupo “leucócitos” é composto por 12 pacientes saudáveis com idade média de 39,8 anos ( $\pm 11,3$ ) e o ensaio para determinar o tamanho dos telômeros foi feito na mesma condição que o das amostras de próstata. Esses dados foram produzidos por outro estudo (já publicado) do nosso laboratório e reutilizados para esta tese (135).



**Figura 25.** Envolvimento do tamanho dos telômeros no câncer de próstata. Em A temos a comparação do tecido maligno com o controle na coorte clínica. Em B, C, D e E temos a relação do tamanho dos telômeros com fatores prognóstico (PSA, ISUP, estadiamento patológico e recidiva bioquímica, respectivamente). Em F temos o tamanho dos telômeros nas linhagens celulares. Em G temos o tamanho médio de todas as amostras de próstata estudadas e de um grupo de leucócitos de pacientes saudáveis, dividimos o CP localizado de acordo com o escore de ISUP. Em H temos as correlações entre o tamanho dos telômeros com o PSA pré-operatório, volume tumoral (em cm<sup>3</sup> e porcentagem) e risco do câncer.

Para finalizar os resultados, na tabela 3 vemos o resumo dos resultados obtidos. Temos o fenótipo de cada componente estudado em relação ao controle (coorte TCGA e coorte clínica), e o fenótipo associado ao pior prognóstico. Também resumimos as diferenças genéticas entre o CPRC e o CP localizado (análises de bioinformática) e a expressão gênica dos modelos metastáticos resistentes em relação ao modelo de câncer sensível (linhagens celulares). Para facilitar a visualização, palavras em vermelho representam a superexpressão ou amplificação e palavras em azul a subexpressão

**Tabela 3.** Resumo dos resultados

	CP localizado				CPRC	
	Coorte TCGA		Coorte Clínica		Em relação ao CP localizado	Em relação ao CP sensível
	Controle	Pior Prognóstico	Controle	Pior Prognóstico		
POT1	Sem diferenças	Superexpressão	Sem diferenças	Superexpressão	Amplificação	Superexpressão
TRF1	Subexpressão	Superexpressão	Subexpressão	Superexpressão	Amplificação	Subexpressão
TRF2	Sem diferenças	Superexpressão	Sem diferenças	Tendência a Superexpressão	Sem diferenças	Superexpressão
TPP1	Subexpressão	Superexpressão	Sem diferenças	Superexpressão	Sem diferenças	Sem diferenças
TIN2	Sem diferenças	Superexpressão	Superexpressão	Superexpressão	Amplificação	Subexpressão
RAP1	Sem diferenças	Superexpressão	Superexpressão	Superexpressão	Sem diferenças	Subexpressão
TERT	Sem diferenças	Superexpressão	Superexpressão	Superexpressão	Amplificação	Superexpressão
TERC	Sem diferenças	Superexpressão	Superexpressão	Subexpressão	Amplificação	Subexpressão
CTC1	Subexpressão	Superexpressão	Subexpressão	Superexpressão	Sem diferenças	Contexto dependente
STN1	Sem diferenças	Sem associação	Sem diferenças	Superexpressão	Sem diferenças	Sem diferenças
TEN1	Superexpressão	Superexpressão	Superexpressão	Sem associação	Amplificação	Sem diferenças
TERRA	-	-	Superexpressão	Subexpressão	-	Subexpressão
Tamanho do Telômero	-	-	Mais longo	Mais longo	-	Contexto dependente



## **5. Discussão**

## 5.1 Complexo Shelterin

### 5.1.1 POT1

*Protection of Telomeres 1* ou simplesmente POT1 é uma proteína traduzida da região 7q31.33 e é um gene muito estudado em oncologia. Nossos resultados são coerentes e corroboram a hipótese que o aumento da expressão gênica da POT1 está relacionado com pior prognóstico do CP. Isso por si só já é informação nova, pois não existe nenhum relato na literatura que descreve algum tipo de relação entre a POT1 e o CP. Adicionalmente, os resultados obtidos demonstram o potencial de POT1 para se tornar um biomarcador no CP.

Apesar da falta de informação no CP, existem diversos casos de associação entre a POT1 e outros tipos de tumores. Mutações germinativas em POT1 aumentam o risco de melanomas, leucemias, angiosarcomas, gliomas, entre outros (136). Além disso, mutações somáticas no gene da POT1 são associadas a vários tumores esporádicos, como linfomas, câncer de paratireoide, câncer de mama e melanomas (136).

Em relação à expressão de POT1, sua superexpressão já foi relatada em câncer colorretal, câncer de células renais, carcinoma hepatocelular, mieloma múltiplo e linfoma de células do manto e sua subexpressão em câncer de mama (137, 138, 139, 140, 141, 142, 143). A literatura ainda apresenta alguns dados contrastantes, como no exemplo do câncer gástrico em que a expressão varia de acordo com a fase do tumor, sem seguir um padrão totalmente definido (144, 145, 146).

Considerando nossos resultados, podemos supor o motivo da superexpressão da POT1 estar associada ao pior prognóstico em CP. Primeiramente, é sabido que o aumento da POT1 tende a incrementar a atividade da telomerase e o tamanho dos telômeros e, como será discutido em seções posteriores, o aumento tanto da TERT como do telômero são características de CP mais agressivos (136, 144, 147).

Além disso, deficiência/subexpressão da POT1 gera uma instabilidade genética comum em diversas neoplasias, explicando porque suas mutações são frequentes no câncer. Isso à primeira vista pode parecer paradoxal: como mencionado na introdução, o CP é caracterizado por uma alta instabilidade genética, porém o aumento da POT1 (e, portanto, o aumento da resistência à instabilidade) é associado ao pior prognóstico.

Porém, precisamos recordar que mesmo uma célula tumoral precisa ter certo nível de estabilidade genômica para não entrar em crise genética e, nesse ponto, o fato de mutações da POT1 serem pouco comuns e não existir diferença na expressão entre tecido tumoral e benigno indicam que a POT1 não contribui para estresse genético no CP. Pelo contrário, seu aumento pode intensificar a resistência a danos do DNA em uma célula já muito instável, o que daria uma vantagem adaptativa às células que superexpressam POT1 (148, 149).

Finalmente, uma das principais funções da POT1 é proteger a 3'G overhang de ser reconhecida pela via de sinalização ATR, suprimindo a cascata que levaria a célula a entrar em apoptose/senescência (136). Nesse sentido, um trabalho recente mostra que nos CP mais agressivos é comum a deficiência de ATM e que nesses tumores a inibição da ATR é uma efetiva estratégia terapêutica (150). Isso indica que em tumores mais agressivos, a via da ATR é bastante importante e, que o excesso de POT1 impediria que essa via interagisse com o DNA telomérico, suprimindo o efeito supressor tumoral dessa cascata bioquímica.

### 5.1.2 TRF1

A proteína TRF1 tem como principais funções a proteção dos telômeros e a inibição da atividade da telomerase. Curiosamente, para inibir a telomerase ela interage com a proteína PINX1, que já foi descrita como subexpressa no CP (151). Além disso, sua localização cromossômica (8q21) é uma região altamente amplificada no CP, com relatos de implicações prognósticas (152, 153, 154). Nossos resultados com este gene fogem do padrão apresentado nesta tese, abaixo os discutiremos.

Os resultados das análises do DNA podem nos levar a concluir que a amplificação de TRF1 é um evento importante na aquisição do fenótipo resistente a castração, onde o câncer evolui para metástase resistente aos tratamentos de bloqueio hormonal. Como normalmente os pacientes com CP só morrem quando a doença progride para CPRC, investigamos se as alterações no TRF1 podem impactar a sobrevida geral dos pacientes (155).

Os dados da sobrevida global em relação às alterações genéticas de TRF1 sugerem que as amplificações estão associadas à agressividade do câncer apenas no CP localizado. O provável motivo da grande proporção de alterações no CRPC se deve ao fato de serem justamente esses tumores mais agressivos que evoluem para o fenótipo letal, mas a amplificação em si não altera o prognóstico desses pacientes.

A expressão gênica indica um melhor prognóstico associado com baixa expressão TRF1. Também corroboramos a relação entre o eixo androgênico e a biologia do telômero no desenvolvimento do CP, apoiando a teoria de que a RA pode estar diretamente relacionada à manutenção do telômero na neoplasia (118).

Nossos resultados reforçam a ideia de que a expressão de TRF1 é importante para a manutenção dos telômeros e imortalização de células cancerígenas, evitando danos ao DNA telomérico e modulando a diferenciação das células malignas. A falta de proteção do telômero pela depleção genética de TRF1 bloqueou efetivamente a iniciação e progressão de tumores agressivos de pulmão e glioblastoma e um estudo propôs a inibição genética de TRF1 como um possível tratamento molecular no glioblastoma multiforme (156, 157, 158).

Por outro lado, durante a progressão de neoplasias para estágios avançados, o encurtamento dos telômeros, a instabilidade cromossômica e aumento da agressividade do tumor, têm sido relacionados à diminuição progressiva do TRF1 (159). Nossos resultados usando linhagens celulares metastáticas reforçam esta teoria. Demonstramos uma subexpressão progressiva de TRF1 da célula sensível à castração para as células resistentes à castração. No câncer de mama, a regulação negativa de TRF1 está relacionada a uma maior instabilidade genômica e um aumento na radiorresistência (133, 160). No CP há relatos que a superexpressão de TRF1 está relacionada a fatores prognósticos desfavoráveis (134, 161). Aqui, também mostramos que a baixa expressão de TRF1 está relacionada a um melhor prognóstico no CP localizado.

Nossos resultados indicam que a depleção de TRF1 e a disfunção telomérica são importantes para as primeiras etapas da carcinogênese (CP localizado) e são suplantadas por outras disfunções durante a progressão do tumor. Após as primeiras etapas da carcinogênese, provavelmente para evitar crise genética, algumas células tumorais recuperam a expressão de TRF1, por um mecanismo desconhecido, e progridem para um fenótipo agressivo com certo nível de estabilidade genômica (como observado em células

LNCaP e em tumores localizados agressivos). Aqui é importante lembrar que, embora a instabilidade genética seja importante para o câncer, níveis muito elevados de instabilidade genômica podem ser prejudiciais à progressão da neoplasia por várias razões por exemplo, como o aumento de neoantígenos (162).

Amplificações de TRF1 aumentaram consideravelmente na coorte de CPRC, mas essas alterações não foram muito relevantes neste estágio da doença. Nas linhagens celulares DU145 e PC3, mostramos uma menor expressão de TRF1 o que corrobora este resultado. Nessas duas linhagens celulares, a subexpressão de TRF1 está provavelmente associada à retomada da instabilidade genética, presente em ambas as células e ao fato de serem RA-negativas (163).

Nossos resultados sugerem que a amplificação/superexpressão de TRF1 está ligada a uma população de CP localizados mais agressivos e que essa molécula tem potencial para se tornar um biomarcador nesse tipo de doença. Esses resultados foram publicados em uma revista internacional indexada e está aberto para a utilização pela comunidade científica (164).

### 5.1.3 TRF2

*Telomeric repeat-binding factor 2* ou TRF2 é uma proteína traduzida da região 16q22.1 e é um componente fundamental do complexo shelterin, interagindo diretamente com o DNA de dupla fita telomérica.

Levando em consideração a literatura, encontramos um relato que a TRF2 está superexpressa no CP em relação à HPB em nível proteico, porém, sem relação com a progressão tumoral (161). Além disso, alterações genéticas de TRF2 foram relacionadas à disfunção telomérica severa em células tumorais circulantes de pacientes com CP localizado de alto risco, o que sugere que essa molécula tem uma relação com a progressão da doença (165).

Finalmente, um estudo recente postula que a TRF2 regula a tumorigênese da próstata por modular danos ao DNA dos telômeros (166). Nesse estudo, os autores discutem que a diminuição da expressão de TRF2 promove a carcinogênese nas células tronco tumorais que conseguem resistir a morte celular, porém a redução conjunta de

TRF2 com TERC prejudica de maneira decisiva a progressão/iniciação do câncer. Isso sugere que, apesar de alterações em TRF2 serem importantes na progressão CP, suas consequências, isto é, se vai ser positivo ou negativo para a progressão do tumor, dependem de outras alterações moleculares, o que indica que a função dessa molécula é contexto-dependente no CP.

Nossos resultados corroboram esta hipótese; só detectamos diferenças na expressão de TRF2 entre câncer e controle na coorte clínica, pois a distribuição dos dados do tecido tumoral na coorte do TCGA foi muito grande. Além disso, nossos resultados experimentais indicam que a diminuição de TRF2 está associada ao aumento do PSA, mas seu aumento está associado ao pior escore de ISUP, tumores não confinados, além do aumento do volume tumoral. Na mesma direção, os resultados da coorte do TCGA e das linhagens celulares sugerem que é seu aumento que se associa ao pior prognóstico.

Curiosamente, a uma das consequências da superexpressão de TRF2 é a instabilidade genética e apesar da PC3 ser a célula mais agressiva, a DU145 apresenta uma maior instabilidade genética, o que pode, parcialmente, explicar a maior expressão nessa linhagem celular (163, 167).

Com isso, especulamos que para determinar o papel de TRF2 no CP, bem como sua possível classificação como biomarcador, precisamos considerar outras alterações genéticas e moleculares. Este trabalho demonstrou que uma maior tendência da superexpressão de TRF2 associada a piora de prognóstico, mas isso não é global e precisa ser mais estudado, como demonstrado pela associação do PSA na coorte clínica e da significância estatística marginal na coorte do TCGA. A literatura citada anteriormente também corrobora essa dualidade. Nesse sentido, considerando que uma das principais funções de TRF2 é a inibição da via ATM nos telômeros e essa via é bastante relevante no CP, o rastreamento concomitante de alterações em ambas moléculas pode se mostrar uma estratégia promissora na prática clínica (168, 169, 170).

Além disso, considerar as funções extra teloméricas de TRF2, como controle da expressão gênica, interação com maquinaria de reparo e impacto na diferenciação celular, pode ser importante para entender seu papel na patogênese do CP e até de outros tipos tumorais (171, 172).

#### 5.1.4 TPP1

A proteína TPP1, traduzida do gene ACD localizado na região 16q22.1 ocupa uma região central na manutenção da homeostase telomérica, pois, apesar de não interagir diretamente com o DNA do telômero apresenta sítios de ligação para a telomerase, para outras proteínas do complexo shelterin e para o complexo CST (56, 58).

Observamos resultados não totalmente coerentes na expressão de TPP1 na comparação entre tecido maligno e controle nas análises das coortes clínicas e do TCGA. Podemos pensar em duas razões para isso: a primeira é que uma população brasileira (coorte clínica) diverge da população do TCGA em relação à expressão gênica de TPP1. A segunda é o grupo controle utilizado, enquanto o TCGA usou tecido normal adjacente ao tumor, nossos experimentos utilizaram amostras de HPB, o que pode sugerir que essa doença, apesar de benigna, tem uma subexpressão de TPP1. Aqui vale ressaltar que o HPB é composto por células com características senescentes e existem relatos na literatura que demonstram que o HPB possui a biologia dos telômeros alterada (109, 166, 173, 174).

De qualquer maneira, nossos resultados corroboram a hipótese que o aumento de TPP1 está relacionado ao pior prognóstico do CP. Na literatura não temos nenhum relato da relação de TPP1 com o CP.

Em outros tumores, temos algumas informações pertinentes do papel de TPP1. Por exemplo, um estudo demonstrou que uma variante de TPP1 aumenta o risco de câncer colorretal, por interromper a interação com a proteína TIN2 e diminuir o tamanho do telômero (175).

Em relação a sua expressão, existem alguns relatos que corroboram que, assim como nos nossos resultados, o aumento da TPP1 se associa a tumores mais agressivos. A superexpressão de TPP1 está presente em câncer colorretal e gliomas de alto grau e sua expressão se correlaciona com o pior prognóstico, sendo que sua inibição aumenta a radiosensibilidade desses tumores (176, 177). Resultados semelhantes foram demonstrados em células de osteosarcomas telomerase negativas e ALT positivas, o que indica que a TPP1 é fundamental para a homeostase dos telômeros para ambos os mecanismos de manutenção (ALT e telomerase) (178).

Considerando o CP, como já mencionado anteriormente, a telomerase é fundamental na patogênese da doença. Isso é relevante, pois o principal mecanismo oncogênico da TPP1 é o aumento da atividade/recrutamento da telomerase e, portanto, aumento no tamanho dos telômeros, e isso fica evidente quando inibição do recrutamento da TERT por uma TPP1 mutante suprime a proliferação celular em células de câncer de pulmão (179). É interessante notar que a função de aumento da atividade da telomerase da TPP1 depende da sua interação com a POT1 e que nós também observamos um aumento na expressão desse gene relacionado ao pior prognóstico do CP (180). Além disso, discutiremos mais adiante como o aumento dos telômeros pode conferir uma vantagem adaptativa para as células de CP, o que pode representar uma eventual explicação para nossos resultados.

### 5.15 TIN2

A proteína TIN2 regula o tamanho do telômero por interagir diretamente com TRF1, sendo traduzida da região 14q12. Quando consideramos nossos resultados, observamos que a superexpressão de TIN2 se associa ao tecido maligno e ao pior prognóstico.

Levando em consideração a literatura, é interessante ressaltar que um estudo demonstrou que um mutante negativo-dominante de TIN2 causa a morte de células de CP RA negativo, mas não células RA positivo (181). Além disso, um trabalho posterior do mesmo grupo relatou que inibidores do RA causam a disrupção telomérica somente em células RA positiva e que o RA interage diretamente com a proteína TIN2 (118). Isso indica que o RA regula/interage com a biologia telomérica no CP, como mencionado na introdução. Quando consideramos a já citada relação entre a telomerase e o RA podemos imaginar que essa interação ocorra pela TIN2. Nossos resultados são coerentes com essas informações.

Primeiramente, temos a presença de amplificações em TIN2 somente no CPRC, um estágio da doença que sabidamente ocorre amplificações/hipersensibilidade do RA (182). Além disso, apesar do aumento da expressão do RA ser comum no CP agressivo, tumores indolentes não necessariamente superexpressam essa proteína (183). Finalmente considerando as linhagens celulares, temos a superexpressão de TIN2 somente na



LNCaP, uma célula altamente dependente da via androgênica e do RA (184, 185). Adicionalmente, temos que o aumento da TIN2, assim como a maioria dos outros genes estudados nesse trabalho, se correlaciona com a piora do prognóstico do CP

Sugerimos que o papel de TIN2 no CP depende da expressão do RA, o que corrobora a hipótese que a via androgênica interage com a biologia dos telômeros na progressão da doença, porém estudos aprofundados precisam ser realizados antes de tirarmos conclusões mais robustas.

### 5.2.6 *RAP1*

A proteína RAP1 é traduzida do gene TERF2IP (16q23.1) e é a mais conservada proteína telomérica na escala evolutiva. Apesar de sua importância na homeostase telomérica, também não encontramos nenhum relato na literatura sobre o seu papel no CP. Levando em consideração outros tumores temos relatos de mutações na RAP1 aumentando o risco para melanomas (186). Além disso, já foi relatada uma subexpressão desse gene em leucemias (187).

Curiosamente, apesar da vasta literatura sobre o papel de RAP1 na regulação telomérica, em oncologia suas funções extra-teloméricas vem ganhando importância (188). Por exemplo, já foi demonstrado que o aumento de RAP1 está associado ao pior prognóstico e resistência a quimioterapia, por mecanismos não-teloméricos, em tumores de mama, cólon e pulmão (189, 190). Dados indicam que algumas dessas funções são relevantes para o CP.

Assim como a proteína TRF2, o RAP1 também modula a expressão gênica, o que é interessante considerando que o RA é basicamente um fator de transcrição (191). Na realidade, a expressão de TRF2, de RAP1 e do tamanho dos telômeros relacionam-se diretamente com a regulação da transcrição e considerando que existe uma relação entre a biologia dos telômeros e o RA, podemos hipotetizar que eles atuam em conjunto na modulação da expressão global durante a progressão do CP (192). Em um trabalho recente, discutimos como a modulação de padrões globais de expressão são importantes para a patogênese do CP e como os componentes teloméricos se encaixam nesse processo (193).

Adicionalmente, é descrito que o aumento de RAP1 promove processos inflamatórios e aumento de estresse oxidativo, o que é uma característica marcante da carcinogênese da próstata (111, 112, 113, 194).

Finalmente, um estudo com modelo animal demonstrou que a depleção de RAP1 causa obesidade e altera todo o metabolismo lipídico, o que demonstra que esse gene interage com essa via (195). Isso é interessante, visto que a obesidade e o colesterol têm um papel importante na progressão do CP, uma linha de pesquisa explorada em nosso laboratório (196, 197, 198). Isso sugere que o estudo de RAP1 na doença pode ser uma estratégia importante uma vez que afeta diretamente diferentes vias da patogênese do CP.

Ainda vale ressaltar que apesar das funções descritas acima serem consideradas “não teloméricas”, elas influenciam ou são influenciadas pelos telômeros. Primeiramente, o papel de regulador da transcrição de RAP1 depende do tamanho telomérico. Além disso, como já discutido na introdução, a inflamação e o estresse oxidativo são particularmente danosos ao DNA telomérico. Finalmente, um estudo recente demonstra que a obesidade está associada ao menor comprimento dos telômeros nas células do estroma da próstata em homens com CP agressivo (199).

## 4.2 Telomerase

### 5.2.1 *TERT*

A TERT é a unidade catalítica da enzima telomerase, a principal enzima responsável pela imortalização celular e muito estudada em processos de carcinogênese. Nossos resultados corroboram a literatura, já mencionada na introdução, sobre a reativação da telomerase no CP.

É importante ressaltar que em uma importante revisão sobre o tema, os autores discutem que apesar de o aumento da expressão da TERT ser uma etapa obrigatória para o aparecimento do CP, sua expressão continua sendo muito baixa, o que dificulta sua detecção pelos métodos analíticos (109). Esse fato provavelmente justifica a ausência da significância estatística quando comparamos as amostras de CP com o controle na coorte do TCGA: o teste de hipóteses utilizado pelo GEPIA (software onde essas análises foram feitas) considera que como existem muitos valores de expressão igual a zero (ou muito

próximos de zero) em ambas as casuísticas, não existe diferença significativa entre elas, mesmo com uma clara superexpressão no CP.

Em nossos experimentos, também tivemos essa dificuldade técnica nas amostras clínicas, com cerca de 55% das amostras de CP sem detecção da TERT. Isso justifica o fato de confirmarmos os resultados de expressão deste gene, em relação aos fatores prognóstico, com análises de contingência (detecção *versus* não-detecção da expressão). Curiosamente, detectamos a expressão da TERT em 40% das amostras de HPB, o que novamente indica que a biologia telomérica é alterada nessa doença benigna (109, 166, 173, 174). Isso também limita uma possível aplicação da detecção de TERT (ou até mesmo da atividade de telomerase, uma técnica que contornaria a baixa expressão) no diagnóstico do CP, que é proposta por alguns autores (109).

Além disso, é importante notar que a linhagem celular PNT2, que é derivada de um epitélio prostático normal e foi imortalizada por modificações genéticas, expressa a telomerase em pequenas concentrações, como o esperado. Curiosamente, os níveis de expressão de TERT entre a PNT2 e a LNCaP são bastante semelhantes, o que indica que a linhagem linfonodal mantém os níveis do gene no limite necessário somente para manter sua replicação.

De qualquer maneira, nossos resultados seguiram o esperado: a uma superexpressão da TERT no tecido maligno e sua superexpressão está relacionada ao pior prognóstico.

Os nossos dados nas alterações genômicas da TERT corroboram a literatura. Apesar de alterações no gene da TERT estarem entre as mais comuns em diversas neoplasias, elas são bastante raras no CP (200). Isso reforça a ideia que a ativação da telomerase no CP se dá por mecanismos epigenéticos, sobretudo ligado a modulação da atividade da telomerase pelos RA, como mencionados na introdução (117).

Além disso, o aumento do número de amplificações na coorte do CPRC sugere que o aumento da TERT é associado ao pior prognóstico do CP. Corroborando isso, nossos resultados de expressão mostram que o aumento da TERT está associado à maior agressividade nas coortes clínicas, do TCGA e nas linhagens celulares. A literatura corrobora nossos resultados, apesar de existir certa controversa nesse ponto.

Um estudo demonstra que a expressão da TERT em conjunto com a fusão de TMPRSS2-ERG tem potencial para predizer a recidiva bioquímica (201). Adicionalmente, outro artigo demonstra que medir a expressão gênica de TERT no plasma, pode auxiliar tanto no diagnóstico do CP quanto na segregação de tumores indolentes dos agressivos (202). Um trabalho mostra, por imunohistoquímica, a maior presença da expressão TERT em tumores de maior grau (203). Um ensaio clínico demonstra que o aumento da atividade de telomerase em células tumorais circulantes está associado a uma piora na sobrevida global em pacientes de CPRC (204). Finalmente, em relato recente, é descrito que o gene PITX1 é um regulador da expressão de TERT no CP e funciona como um biomarcador prognóstico (205).

Por outro lado, um estudo demonstra uma diminuição da expressão proteica da TERT em tumores de maior agressividade (206). Além disso, uma pesquisa recente demonstra que a menor concentração nuclear de TERT está associada à recidiva bioquímica, apesar de que esse estudo discute que essa proteína não esteja de fato subexpressa, mas em maior concentração no citoplasma (207).

Outro ponto interessante é a superexpressão nas linhagens PC3 e DU145, ambas com pouca ou nenhuma expressão de RA (184, 185). Isso indica a importância da telomerase em células agressivas, mesmo na ausência dos RA. Um resultado semelhante foi demonstrado em um trabalho onde nas células de CPRC o gene EGR1 (um gene normalmente inibido pelo RA selvagem em células saudáveis) modula positivamente a expressão de TERT (208).

Apesar de existirem funções não teloméricas importantes da TERT no processo da progressão de neoplasias (como por exemplo, no metabolismo mitocondrial, inflamação e regulação da expressão de oncogenes), seu principal mecanismo oncogênico ainda é o alongamento dos telômeros (209). Isso ocorre pois o aumento do tamanho dos telômeros influencia diretamente na capacidade replicativa das células, além de influenciar na diferenciação celular. O aumento da TERT no CP mais agressivo sugere que esses tumores têm telômeros mais longos e/ou se dividem mais rápido, e isso pode ser fundamental para explicar a progressão do CP, sendo discutido com mais detalhes em seções subsequentes desta tese.

### 5.2.2 *TERC*

O RNA não codificante da telomerase serve de molde para a sequência do DNA telomérico, com uma vasta literatura do seu papel oncogênico, inclusive no CP.

Nossos resultados indicam uma pequena proporção de amostras de CP localizado com alterações genômicas no gene da *TERC*, o que, assim como a *TERT*, sugere um controle epigenético sobre o mesmo. Nesse ponto, alguns importantes mecanismos já foram descritos, como o papel do *MYC* na modulação positiva do *TERC*, que favorece a imortalização celular (210).

Apesar disso, temos uma proporção relativamente alta de ampliações de *TERC* no CPRC, o que indica que o aumento de *TERC* tem um papel importante na progressão para o fenótipo mais agressivo da doença. Esse fenômeno já foi descrito em um trabalho, onde foi demonstrado que ampliações nesse gene são comuns na seleção de células resistente a tratamento de bloqueio hormonal (211). Ainda nesse sentido, na coorte do TCGA vemos que a maior expressão de *TERC* se associa com a recidiva da doença, o que contrasta com nossos dados experimentais.

Diferente do esperado, só encontramos a superexpressão de *TERC* no CP em (relação ao controle) na coorte clínica. Porém, isso provavelmente é mais uma questão técnica do que uma biológica. Assim como no caso da *TERT*, a expressão da *TERC* é naturalmente muito baixa, o que dificulta sua detecção por metodologias de sequenciamento e justifica o software não acusar diferenças significativas entre as duas populações. Além disso, o reconhecimento de RNAs não codificantes por metodologias de bioinformática tendem a ser mais complexos do que o usual (212). De qualquer maneira, nossos resultados corroboram a literatura sobre a superexpressão de *TERC* em quase todas as neoplasias, incluindo o CP (213, 214, 215).

Além disso, vemos que todos os nossos da coorte clínica resultados indicam que, surpreendentemente, a subexpressão de *TERC* está associado ao pior prognóstico do CP. Isso foge do esperado, visto que a superexpressão de *TERC* se associa com a imortalização celular e a maior capacidade replicativa. Nesses tumores, provavelmente após eventos de superexpressão, células com a expressão ligeiramente mais baixas são selecionadas durante a progressão da doença

Alinhado a esses resultados, também observamos a maior expressão de TERC na LNCaP, em comparação com a DU145 e PC3 (linhagens claramente mais agressivas). Porém, é importante ressaltar que, apesar de baixa, a expressão de TERC tende a ser constitutiva mesmo em células somáticas e é a TERT que limita a imortalização celular (pela via da telomerase) (52, 214).

Considerando nossos dados, podemos advogar que no CP, apesar da TERC favorecer a imortalização celular, ela tem outras funções na neoplasia, e isso pode sugerir que talvez esse longo RNA não codificante seja contexto-dependente. Quando consideramos as funções não teloméricas da TERC, isso faz ainda mais sentido. Existem trabalhos que demonstram que a TERC modula processos pró-inflamatórios e de disfunção mitocondrial, de uma maneira independente de TERT (216, 217). Ambos fenômenos tendem a criar uma situação que favorece a instabilidade cromossômica (218, 219). A diminuição da TERC nas linhagens celulares e tumores mais agressivos da coorte clínica provavelmente ocorre para frear esse processo; como já discutido, o excesso de instabilidade genética e/ou cromossômica pode começar a ser uma desvantagem seletiva para as células malignas (162).

Essa hipótese é reforçada quando checamos o número médio de cromossomos em cada uma das linhagens celulares, em sua ficha técnica na ATCC. A LNCaP tem 84 cromossomos, enquanto a PC3 e a DU145 têm 62 cromossomos cada. Isso sugere que, apesar das células de CP/PC serem mais geneticamente instáveis, elas passaram por um processo de estabilização no número dos cromossomos e a diminuição da expressão TERC pode ter influenciado esse processo (163, 167). Além disso, a expressão da TERC, e até de outros genes teloméricos estudados, como TRF1, TIN2 e RAP1, parece estar associada à instabilidade cromossômica das células de CP, o que é mais um indicativo do potencial prognóstico dessas moléculas (220, 221).

Finalmente, é impossível discutir o papel da telomerase (TERT + TERC) no câncer sem falar no seu claro potencial terapêutico, ainda mais considerando que nossos resultados indicam que a superexpressão de TERT pode favorecer a agressividade do tumor. A telomerase parece ser o alvo anti-oncogênico perfeito: ela está ativa em 90% das neoplasias e inativa na grande maioria das células somáticas.

Apesar disso, temos que ter cautela nesse ponto por dois motivos principais. Primeiramente, a inibição da telomerase tende a selecionar células malignas com fenótipo

de ALT e isso inclusive já foi observado em um trabalho com células de CP, em que a perda de TERC e ATRX promove o aparecimento desse fenômeno (222). Adicionalmente, a inibição da telomerase não mata a célula diretamente, só restringe sua capacidade replicativa. O problema nisso é que antes da célula morrer, elas passam por uma diminuição progressiva dos seus telômeros, em decorrência das divisões celulares, o que pode aumentar a instabilidade genética e ser potencialmente ruim para o paciente (isso inclusive pode gerar mutações que favoreçam o ALT). Corroborando essas limitações, os agentes quimioterápicos imetelstat e GV10, que atuam diretamente na inibição da telomerase, já foram testados em ensaios clínicos. Infelizmente, eles não melhoraram a taxa de sobrevivência dos pacientes, porém suas relevâncias clínicas ainda não foram totalmente abandonadas (223).

Feito essa ressalva, a inibição terapêutica da telomerase ainda é bastante estudada, inclusive no CP. Uma possível estratégia seria combinar terapias anti-telomerase com outros tratamentos. No CP, uma possível estratégia seria inibir a telomerase em conjunto com a privação de andrógenos, visto que eles atuam em conjunto na progressão tumoral (109). Nesse sentido, um trabalho demonstrou que o uso combinado de enzalutamida com a inibição da telomerase, potencializou o efeito terapêutico na doença hormônio-sensível (224). Outro estudo demonstrou que a inibição química de telomerase aumentou o número de células senescentes de CP *in vitro* (225). Finalmente, podemos citar que a depleção da telomerase parece inibir preferencialmente as células iniciadoras de tumor de próstata (226).

## 4.4 Complexo CST

### 5.3.1 CTC1

O complexo CST é essencial para a homeostase dos telômeros e, portanto, estão envolvidos em processos de carcinogênese (227). Apesar disso, não existe nenhum relato na literatura sobre seu papel no CP. CTC1 é o maior e principal componente do complexo sendo responsável pela interação direta com o DNA. Este gene apresenta um padrão de expressão que sugere uma importância no CP, tendo potencial para se tornar um relevante biomarcador.

Nossos resultados demonstraram que poucas alterações genéticas de CTC1 estão presentes no CP. Na literatura existem alguns relatos que mutações em CTC1 podem aumentar o risco para algumas neoplasias (228, 229). Além disso, é interessante notar que as maiorias das alterações são do tipo deleção e isso faz ainda mais sentido quando consideramos que a expressão de CTC1 está diminuída no CP, em ambas as populações estudadas.

Por outro lado, vemos que durante a progressão da neoplasia para um estágio mais agressivo, temos o aumento de CTC1. Em outros tumores, temos que a redução de CTC1 leva à redução da sobrevida em pacientes com câncer de mama, pulmão e gástrico e sua superexpressão aumenta a radiorresistência nas células do melanoma, evitando o encurtamento do telômero e a apoptose, o que indica que o papel desse gene varia de acordo com o tipo do câncer (227, 230). Nas linhagens celulares, CTC1 é superexpresso nas células LNCaP e PC3 em comparação com o controle e DU145.

Esses resultados podem parecer contraditórios, mas quando nos lembramos das funções do CTC1, eles fazem sentido. O CP é caracterizado por uma enorme heterogeneidade genômica causada por grave instabilidade genética nos estágios iniciais da carcinogênese e, como mencionado anteriormente, as deficiências de CTC1 promovem instabilidade genética (231). Isso significa que, nas primeiras etapas da carcinogênese, as deficiências/subexpressão de CTC1 provavelmente favorecem o início do CP ao contribuir para o encurtamento dos telômeros/instabilidade genética. Aqui é importante lembrar que o encurtamento dos telômeros é a alteração genética mais prevalente nessa doença (109).

Por outro lado, as células do câncer precisam evitar o excesso de dano ao DNA/instabilidade genética para progredir para um estágio mais avançados (162). A superexpressão (ou ausência de deficiências) do CTC1 pode promover esses dois fenômenos, agindo na proteção dos telômeros e interagindo com maquinarias de respostas a danos no DNA(232).

Esta é provavelmente a razão pela qual observamos uma prevalência de deleções/subexpressão de CTC1 no CP localizado, mas os tumores mais agressivos superexpressam este gene. Isso é corroborado pelos resultados observados em LNCaP e PC3, duas linhagens completamente diferentes, que superexpressam CTC1 e são claramente mais agressivas do que CP indolente. Em DU145, CTC1 está subexpresso, o



que indica que nesta linhagem celular, a proteção do DNA não depende do CTC1. Interessantemente, DU145 é a linhagem celular geneticamente mais instável e é derivada de um local de metástase não tão comum para o CP, apresentando um microambiente muito incomum, o que pode explicar parcialmente essa exceção (163).

Além disso, uma das principais funções de CTC1 é terminar a replicação do DNA, o que tende a aumentar o tamanho dos telômeros com a superexpressão desse gene (233, 234). O papel oncogênico desse processo será discutido em detalhes em seções posteriores desse trabalho.

### 5.3.2 *STN1*

STN1 é uma proteína traduzida do gene *OBFC1* (10q24.33) e também não encontramos estudos sobre esta molécula no CP.

Na literatura, a maioria dos relatos sobre a possível função de STN1 no câncer se concentram em trabalhos mecanísticos, sobretudo sobre sua influência no tamanho do telômero (233, 234). Nesse sentido, alguns artigos estudam o papel de mutações nesse gene e sua influência no tamanho telomérico (235, 236, 237, 238). Ainda, outros estudos relatam que mutações no STN1 aumentam o risco para os cânceres de laringe e ovário (239, 240).

Adicionalmente, STN1 interage diretamente com a DNA Polimerase  $\alpha$ , sendo fundamental para prevenir o estresse genético durante a replicação do DNA (241). Além disso, STN1 tem papel fundamental em vias de reparo do DNA, onde sua depleção aumenta a eficiência de inibidores da PARP1 em tumores deficientes em BRCA1 (242).

Isso indica que o aumento de STN1 ocorre em resposta ao aumento do estresse genético, o que é coerente com sua superexpressão nas três linhagens celulares de CPRC e no CP localizado mais agressivo. A superexpressão de STN1 pode garantir alguma vantagem seletiva às células malignas, deixando-as mais resistente a instabilidade genética. Corroborando isso, observa-se que a supressão de STN1 aumenta a citotoxicidade em células de câncer, por aumentar os danos ao DNA (243). Nesse sentido, provavelmente a STN1 tem um papel prognóstico semelhante a CTC1, o que é coerente considerando que elas atuam em conjunto.

### 5.3.3 *TEN1*

*TEN1* é a única subunidade do complexo que não interage diretamente com o DNA; portanto, é pouco pesquisado em humanos e as informações encontradas sobre esse gene em doenças estão principalmente associadas a outras subunidades do CST (106, 232, 244).

Apesar disso, obtivemos alguns resultados interessantes sobre esse gene no CP. Primeiramente, vemos que o número de amplificações aumenta e são relativamente comuns no CPRC. Vemos ainda, que esse gene está superexpresso em todas as amostras de câncer estudadas. Finalmente, observamos uma tendência de a sua superexpressão estar associada ao pior prognóstico na coorte do TCGA. Todos esses dados indicam que a superexpressão de *TEN1* está relacionado com o processo de carcinogênese do CP.

As razões para isso devem-se provavelmente ao papel essencial de *TEN1* na homeostase do telômero, sobretudo na proteção da Fita G e no termino da replicação do DNA (245, 246). Além disso, assim como *CTC1* e *STN1*, há relatos que *TEN1* é importante para diminuir o estresse da replicação do DNA, o que pode garantir uma vantagem seletiva para as células que superexpressam esse gene, em um contexto de instabilidade genética generalizada (247).

## 5.4 **TERRA**

A descoberta do longo RNA não codificante *TERRA*, feita quase simultaneamente por dois grupos independentes, adicionou mais uma camada na complexidade da regulação da homeostase telomérica (61, 248). Apesar de já existirem relatos do papel do *TERRA* em diferentes neoplasias, a única menção encontrada sobre o CP, é em um estudo que mostra que a expressão extracelular deste RNA não é alterada em pacientes com a doença (249, 250).

É importante ressaltar que por ser um RNA relativamente recém-descoberto, sua anotação não está feita nas maiorias dos softwares de análise de coortes do TCGA, o que explica a ausência de dados nesse sentido.

Além disso, o TERRA pode potencialmente ser transcrito de qualquer região subteloamérica, apesar de existir algum conflito na literatura nesse ponto. Enquanto alguns autores defendem que o TERRA é preferencialmente transcrito de um único cromossomo, outros afirmam que a transcrição deste RNA depende do contexto e que normalmente mais de um telômero contribui para sua expressão (251, 252).

Isso é relevante, pois no presente trabalho, nossa abordagem nos permitiu mensurar a expressão de TERRA transcrito de 4 cromossomos diferentes (os braços longos dos cromossomos 1,2,10 e 13), com uma metodologia já validada na literatura (127). Ou seja, apesar de isso nos dar uma boa noção da expressão de TERRA no CP, ela não representa sua totalidade.

Nossos resultados indicam uma clara superexpressão do TERRA no CP em relação ao tecido controle. Isso a princípio é contrário ao que normalmente se vê em outros tumores: neoplasias telomerase positivas, como o CP, normalmente subexpressam o TERRA e neoplasias ALT positivas superexpressam (253). Isso ocorre pois normalmente o TERRA inibe a atividade da telomerase (254).

Apesar disso, estudos demonstram outra função importante do TERRA. Está molécula aumenta em resposta a danos do DNA para proteger o telômero, que é normalmente mais sensível que o resto do genoma, (253, 255, 256, 257). Um estudo recente, por exemplo, nos mostra que o TERRA interage com ATRX na manutenção de G-quadruplex, e sabemos que essa proteína é fundamental na resposta à danos do DNA e alterada em diversas neoplasias (258, 259).

Quando lembramos que durante o processo da carcinogênese da próstata, danos aos telômeros são bastante comuns, talvez esse seja o motivo para a grande superexpressão de TERRA na neoplasia em relação ao controle. Isso faz mais sentido quando consideramos que telômeros mais longos aumentam a metilação da região subteloamérica e, portanto, diminuem a expressão de TERRA (260). Como já mencionado na introdução, o CP é caracterizado por apresentar telômeros anormalmente curtos, o que justifica a alta expressão de TERRA mesmo na presença da telomerase. Finalmente, a superexpressão de TERRA já foi relatada em tecidos de câncer de pulmão telomerase positivo, o que indica que esse fenômeno realmente ocorre (261).

Por outro lado, temos que a diminuição de TERRA se correlaciona com o pior prognóstico da doença, o que indica que quando o CP progride, a diminuição de TERRA

deve favorecer a atividade de telomerase. Aqui vale lembrar que nossos resultados claramente indicam que o aumento de TERT, se associam ao pior prognóstico. Ainda é curioso observar que ambos os longos RNA não codificantes estudados aqui (TERC e TERRA) se comportam de maneira semelhante, sua maior expressão é protetiva, ao menos na coorte clínica. Em tumores de cabeça e pescoço, a baixa expressão de TERRA se associa com a piora na sobrevida dos pacientes (262). No câncer colorretal, a diminuição do TERRA foi considerada um fator prognóstico independente para o pior desfecho do tumor a longo prazo (263). Por outro lado, um trabalho demonstrou que no glioma o aumento do TERRA se associa com uma tendência de melhora de sobrevida, o que indica que o valor prognóstico de TERRA varia de tumor para tumor (264).

Nas linhagens celulares, vemos fenômenos semelhantes: a maior expressão de TERRA está presente na LNCaP, a linhagem celular com maior número de cromossomos. Vale lembrar que danos nos telômeros são um dos principais motivos para aberrações cromossômicas e portanto, o aumento de TERRA pode ser em resposta a isso (79). Porém, temos uma diminuição de sua expressão no CPRC, o que corrobora que o aumento da agressividade é inverso à expressão de TERRA. Na PC3, apesar dessa diminuição, a expressão de TERRA é maior na linhagem metastática do que na PNT2, o que reforça o aumento da expressão no CP. Ainda, a menor expressão de TERRA ocorre na DU145, a linhagem celular com maior expressão de TERT e como será visto a seguir, com os maiores telômeros.

O papel de TERRA no CP e em outras neoplasias ainda precisa ser elucidado, mas nossos resultados indicam que sua expressão pode ser relevante nessa doença e que ele tem potencial para se tornar um biomarcador.

## **5.5 Tamanho do Telômero**

O tamanho do telômero é um biomarcador vastamente estudado na medicina, pois tem grande impacto em processos patológicos e de envelhecimento (265). É importante destacar que normalmente o estudo do tamanho do telômero no câncer é feito principalmente de duas formas: avaliando os telômeros dos leucócitos, que são um bom representativo do telômeros de todo o organismo, ou se avalia os telômeros diretamente no tecido tumoral (266). Essa consideração é essencial para interpretar de maneira

adequada esse tipo de parâmetro, visto que normalmente, os resultados podem levar a conclusões opostas de acordo com a fonte da amostra, isto é, sangue ou tecido maligno.

Por exemplo, pessoas com telômeros leucocitários mais longos tendem a ter um risco aumentado para o câncer, pois de maneira geral suas células passam por mais divisões celulares o que aumenta a chance de ocorrerem mutações oncogênicas (267). Alguns estudos corroboram que o aumento do tamanho do telômero aumenta o risco para o CP (268, 269). Apesar disso, no também CP já foi relatado o oposto: o menor tamanho telomérico aumenta os riscos para a doença (270, 271).

Quando pensamos no prognóstico do CP, também temos estudos conflitantes, onde a maioria dos autores defendem que o aumento no tamanho dos telômeros leucocitários se associa com o aumento da agressividade da doença, alguns relatam o oposto (272, 273, 274, 275). Isso sugere que apesar do tamanho global dos telômeros do organismo estar relacionado com o CP, tanto no risco quanto no prognóstico, seu papel exato é complexo e ainda precisa ser elucidado.

De qualquer maneira, neste trabalho nós mensuramos o tamanho do telômero diretamente no câncer e não em leucócitos. Primeiro, é importante ressaltar que a técnica utilizada (PCR em tempo real) apesar de ser bastante utilizada, apresenta algumas limitações, sobretudo no câncer. Isso ocorre pois no controle interno da reação, originalmente, utiliza-se um gene de cópia única. Em neoplasias, incluindo o CP, é extremamente comum a presença de aneuploidias, o que dificulta a escolha de um gene de cópia única confiável. Para contornar essa limitação, utilizamos outro tipo de controle proposto por um grupo de pesquisa, onde eles validaram a utilização de PCR em tempo real para medir os telômeros de células tumorais (129).

Além disso, apesar dessa técnica não fornecer um tamanho absoluto dos telômeros, o que dificulta comparações diretas entre dados de laboratórios diferentes, ela é bem mais barata, mais simples e de mais fácil interpretação do que as outras metodologias, o que indica que se no futuro o tamanho dos telômeros for aplicado na oncologia, provavelmente será a partir do uso dela (276).

Quando analisamos nossos resultados temos uma clara indicação que o aumento dos telômeros tumorais se associam com o aumento da agressividade do CP. Isso a princípio é o contrário do que a literatura afirma.

O encurtamento do telômero é a alteração genética mais comum nos primeiros períodos da carcinogênese da próstata (109, 277). De fato, a literatura postula que o CP é caracterizado por células com telômeros muito curtos quando comparadas às células não-malignas, como tecido adjacente e leucócitos associados, e o encurtamento dos telômeros está associado ao mau prognóstico, promovendo instabilidade genética (109, 278). Mas quando analisamos minuciosamente os artigos que apoiam essas conclusões, temos uma interpretação levemente diferente.

Um estudo clássico que utilizou análise por southern blot, demonstra que amostras de CP de baixo grau têm telômeros encurtados quando comparadas com tecido benigno (115). Outro artigo mostra que telômeros curtos têm sido associados à recidiva da doença, mas, este artigo utiliza análise de dot blot, que é uma técnica obsoleta porque não mede o comprimento dos telômeros em si, e usa pacientes com baixos escores de Gleason (279). Outro trabalho mostra que os telômeros encurtados são piores para pacientes com doença de Gleason 6 (280). Finalmente, já foi demonstrado que a combinação da variabilidade do tamanho dos telômeros tumorais e do comprimento dos telômeros das células do estroma pode prever metástases e morte, o que faz sentido, uma vez que uma grande variabilidade no comprimento dos telômeros é normalmente resultado de um fenótipo ALT e está associada a tumores mais agressivos (281, 282, 283).

No final, todos esses estudos indicam que o encurtamento dos telômeros está associado à instabilidade genética e é essencial no desenvolvimento do CP; as células de CP têm telômeros muito curtos e telômeros encurtados estão associados a pior prognóstico especificamente nas doenças com menor agressividade (baixo escore de Gleason). Mas, é razoável argumentar que as células mais agressivas, com maiores escores de Gleason, maior produção de PSA e pior estadiamento patológico, apresentam telômeros um pouco mais longos, que aumentam o potencial replicativo das células, influenciam na transição epitélio-mesenquimal e diminuem a resposta a danos no DNA (284).

Além disso, o encurtamento de telômeros de células já caracterizada por telômeros muito curtos levará à crise genética e morte celular. Na realidade, promover o encurtamento dos telômeros é proposto como uma opção terapêutica no CP por cientistas muito relevantes no assunto (109). Essa hipótese de telômeros longos no CP agressivo é corroborada em dois trabalhos que mostram que as células de CP com telômeros mais

longos exibem características desfavoráveis com mais frequência (285, 286). Adicionalmente, outro estudo mais recente sugere que homens com telômeros mais longos em lesões pré-malignas tem chance aumentada de desenvolverem CP agressivo (287).

Ainda, em nível de ilustração, comparamos todas as nossas amostras de próstata com leucócitos de pessoas saudáveis. Com isso, observamos que, em média, os telômeros leucocitários são pelo menos cinco vezes maiores do que os telômeros das nossas amostras prostáticas. Pode-se argumentar que o grupo “leucócitos” provém de uma população mais jovem, porém, nenhum valor dos telômeros dessa casuística se aproxima dos telômeros das amostras de próstata, mesmo dos 2 indivíduos com mais de 60 anos presentes neste grupo. Além disso, apesar do efeito do envelhecimento notavelmente diminuir os telômeros, ele sozinho não explicaria essa diferença tão grande. É importante destacar que em pessoas saudáveis, o tamanho dos telômeros dos leucócitos são bastante semelhantes aos telômeros da próstata (266).

Com isso, postulamos que os telômeros do CP são de fato bastante curtos, mas, um pequeno aumento no tamanho dos telômeros garante vantagem seletiva para as células de maior agressividade. É interessante notar, os nossos outros resultados reforçam isso: vemos que com a piora do prognóstico temos o aumento da TERT, proteína principal no alongamento dos telômeros, o aumento de POT1 e TPP1, principais estimuladores da atividade de telomerase, o aumento de TRF1, CTC1 e STN1, o que deixaria os telômeros mais resistente a danos e a diminuição do TERRA, inibidor natural da atividade de telomerase.

Além disso, é importante destacar que tanto a HPB quanto a PNT2 também apresentam telômeros curtos. Quanto a HPB, já discutimos que essa doença, apesar de benigna, apresenta disfunção telomérica. Já a PNT2 precisamos lembrar que ela é uma célula normal que foi imortalizada, ou seja, com baixa atividade de telomerase, tendo telômeros no tamanho limítrofe somente para continuar sua proliferação.

Adicionalmente, observamos que os pacientes com doença intermédiana (ISUP 2 e 3) apresentam os maiores telômeros da coorte clínica. Isso indica que, apesar das doenças mais agressivas (ISUP 4 e 5) apresentarem telômeros maiores que as de menor grau (ISUP 1), temos uma pequena diminuição no tamanho telomérico em relação a doença intermediária, provavelmente decorrente da proliferação celular mais acelerada.

Nas linhagens celulares, vemos que a DU145, a célula com maior expressão de TERT, apresenta os maiores telômeros. Curiosamente, apesar da LNCaP apresentar menor expressão de TERT, ela tem telômeros discretamente mais longos do que a PC3, também provavelmente decorrente da diferença na proliferação celular entre as duas linhagens.

O tamanho dos telômeros tem potencial para se tornar um importante biomarcador prognóstico no CP, principalmente para distinguir doença indolente da agressiva precocemente.

## **5.6 Considerações finais**

Neste trabalho, estudamos como os principais componentes de manutenção telomérica se comportam no CP e qual sua relação com a progressão da doença. Primeiramente, caracterizamos a proporção de alterações genéticas das moléculas estudadas, mostrando que mutações são bastante incomuns. Já a ocorrência de CNVs é bem maior que a de mutações em todos os casos. Além disso, vários dos genes estudados tem um aumento no número de amplificações na coorte de CPRC em relação ao CP localizado. Isso sugere que o papel dos genes associados à manutenção telomérica no CP depende de sua expressão.

Demonstramos que aberrações na expressão desses genes é bastante comum e se comporta de maneira estocástica de acordo com o gene, mas, temos um claro padrão no tamanho dos telômeros. Isso é relevante, pois apesar de suas diversas funções, todos eles modulam canonicamente o tamanho dos telômeros, sendo provável que diferenças na sua expressão convergem para aumentar o DNA telomérico nos graus mais agressivos da doença.

É interessante notar que, apesar de inúmeros estudos envolvendo o CP e a biologia dos telômeros, a maioria deles focam somente no tamanho telomérico e na telomerase. Aqui, adicionamos mais informações sobre genes relevantes para essa via e que se mostram alvos promissores para o estudo do CP. Sobretudo quando consideramos que a maioria dos genes analisados apresentam diferenças relevantes entre os tumores sensíveis a castração e o CPRC. Isso também sugere que a via androgênica tem uma relação



importante com os telômeros o que justifica mais estudos para entendermos melhor a progressão da doença.

A expressão de alguns dos genes estudados e do tamanho dos telômeros tumorais podem ter um papel clínico importante na segregação entre tumores indolentes e agressivos, visto que mudanças na sua expressão associam-se com o aumento da agressividade da doença.

É importante mencionar algumas limitações do presente trabalho. Primeiramente, com exceção de TERC e TERRA, que são RNAs não codificadores de proteínas, todos os genes estudados geram proteínas e aqui somente avaliamos a expressão de seu RNA mensageiro. Ou seja, apesar de a expressão gênica ser um forte indício de alteração da expressão proteica, que é a molécula funcional, não mensuramos diretamente a quantidade dela em nossas amostras.

Além disso, nossa casuística clínica conta com um número amostral relativamente pequeno, com somente 81 amostras de CP e 10 de HPB (grupo controle). Outra limitação é que, apesar de termos uma distribuição considerável nos fatores prognósticos, boa parte dos todos os pacientes tiveram boa evolução clínica. Ademais, menos de 10% dos casos estudados evoluíram para metástase, o que impossibilitou o estudo desse importante parâmetro. Isso limitou uma análise mais aprofundada entre os genes estudados e a agressividade do CP.

Como pontos positivos desta tese destacamos que a maioria dos genes aqui foram raramente estudados em CP. Aqui é interessante destacar que nos últimos anos alguns grupos (incluindo o LIM 55) analisaram o papel geral dos genes do shelterin e do CST em diversos tipos de câncer, e apesar de não focarem especificamente no CP, esses estudos são relevantes e mostram a importância desses genes na oncologia (288, 289, 290).

Além disso, analisamos amostras clínicas, linhagens celulares e dados do TCGA, o que torna nossos resultados mais robustos. Adicionalmente, todas as amostras de CP localizados foram obtidas e analisadas pela mesma equipe, o que aumenta a homogeneidade das avaliações. As análises de expressão gênica foram realizadas por PCR em tempo real, que representa o padrão ouro para esse tipo de ensaio e em um laboratório especializado nessa técnica.

## **6. Conclusão**

A conclusão geral deste trabalho é que os componentes dos complexos shelterin, CST, telomerase e TERRA tem sua expressão alterada durante a progressão do CP. Isso gera um ambiente que induz o aumento telomérico, favorecendo o aumento da agressividade das células tumorais. Esses dados indicam que alterações na biologia dos telômeros são importantes na progressão do CP. Conclusões mais específicas indicam que alguns dos fatores estudados podem se tornar biomarcadores relevantes nos casos de CP. Abaixo as pontuamos:

- As mutações de todos os genes estudados são pouco comuns e sem relevância clara na aquisição do fenótipo mais agressivo da doença. Por outro lado, CNVs são mais comuns no CP localizado, sobretudo em TRF1 e RAP1
- Há um predomínio de ampliações em TRF1, TERT, TERC e TEN1 e de deleções em POT1, TRF2, TPP1, TIN2, RAP1, CTC1 e STN1. Observamos um aumento significativo na proporção de ampliações em POT1, TRF1, TIN2, TERT, TERC e TEN1 no CPRC.
- Na coorte do TCGA, os genes TRF1, TPP1 e CTC1 estão subexpressos e TEN1 superexpresso. Na coorte clínica, TRF1 e CTC1 estão subexpressos e TRF2, TIN2, RAP1, TERT, TERC e TEN1 superexpressos.
- No CP localizado, a superexpressão de POT1, TRF1, TPP1, TIN2, RAP1, TERT, CTC1, STN1 e TEN1 associam-se ao pior prognóstico. A subexpressão de TERRA associa-se ao pior prognóstico. A expressão de TRF2 e TERC se classifica como contexto dependente.
- Nas linhagens celulares metastáticas, os genes POT1, TRF2 e TERT estão superexpressos no CPRC e TRF1, TIN2, RAP1, TERC e TERRA subexpressos. STN1 e TEN1 se encontram superexpressos em todas as linhagens de CP. CTC1 se classifica como contexto dependente.
- Os telômeros são curtos no HPB e no CP, porém significativamente maiores no câncer. O aumento do tamanho telomérico se associa com o aumento da agressividade do CP.
- O tamanho dos telômeros, juntamente com a expressão de POT1, TRF1, TPP1, RAP1, TERT e CTC1 apresentam os resultados mais consistentes em relação à progressão do CP, com claro potencial para se tornarem biomarcadores. O TERRA também apresenta resultados promissores, porém mais estudos são necessários para sua validação como biomarcador.

## Referências

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
2. Stewart BW, Wild C, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. World cancer report 2014. Lyon, France  
Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer  
WHO Press; 2014. xiv, 630 pages p.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
4. Alberts B. Molecular biology of the cell. Sixth edition. ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. 1 volume (various pagings) p.
5. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley JF. Introduction to genetic analysis. Eleventh edition. ed. New York, NY: W.H. Freeman & Company, a Macmillan Education imprint; 2015. xxiii, 868 pages p.
6. Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet.* 2014;383(9916):549-57.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.
9. Câncer de próstata 2018 [updated 2018-11-21. Available from:  
<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>.
10. Key Statistics for Prostate Cancer | Prostate Cancer Facts: @cancer.org; 2021 [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>.
11. @NCICancerStats. Cancer of the Prostate - Cancer Stat Facts: @NCICancerStats; 2021 [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
12. Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol.* 2012;62(4):656-61.
13. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78-85.
14. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol.* 2014;11(1):18-31.
15. Jones AL, Chinegwundoh F. Update on prostate cancer in black men within the UK. *Ecancermedalscience.* 2014;8:455.
16. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005(216):34-63.
17. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-9.
18. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):244-52.
19. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest.* 1985;76(5):1899-903.
20. Barry MJ. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2001;344(18):1373-7.
21. Hernández J, Thompson IM. Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer.* 2004;101(5):894-904.

22. Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, et al. Mortality results from the Göteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):725-32.
23. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1310-9.
24. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1320-8.
25. Mikuz G. Histologic classification of prostate cancer. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2015;37(1):39-47.
26. Bolla M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PM, et al. Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J Clin Oncol*. 2016;34(15):1748-56.
27. Varkarakis MJ, Winterberger AR, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP. Lung metastases in prostatic carcinoma. Clinical significance. *Urology*. 1974;3(4):447-52.
28. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016;387(10013):70-82.
29. Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, Ting DT, Wittner BS, Ulman M, et al. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(11):995-1003.
30. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, Chen RC, Crispino T, Fontanarosa J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part I: Risk Stratification, Shared Decision Making, and Care Options. *J Urol*. 2018;199(3):683-90.
31. Network CGAR. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011-25.
32. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(1):3-23.
33. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*. 1996;28(4):251-65.
34. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*. 2012;33(5):887-94.
35. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(27):3659-68.
36. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8.
37. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009;139(6):1069-83.
38. Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, Esopi DM, Albadine R, Gurel B, et al. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet*. 2010;42(8):668-75.
39. Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(5):445-50.
40. Krajewska M, Kitada S, Winter JN, Variakojis D, Lichtenstein A, Zhai D, et al. Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):3011-21.
41. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;106(6):661-73.
42. Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1441):109-21.

43. Dmitriev PV, Petrov AV, Dontsova OA. Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2003;68(7):718-34.
44. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622-6.
45. Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):484-94.
46. Liu Y, Kha H, Ungrin M, Robinson MO, Harrington L. Preferential maintenance of critically short telomeres in mammalian cells heterozygous for mTert. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3597-602.
47. Aviv A, Levy D, Mangel M. Growth, telomere dynamics and successful and unsuccessful human aging. *Mech Ageing Dev*. 2003;124(7):829-37.
48. Gilson E, Géli V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):825-38.
49. Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, Leviskas B, Kuckovic A, Sanjali A, et al. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(1).
50. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.
51. Londoño-Vallejo JA, Wellinger RJ. Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(9):391-9.
52. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;125:1-40.
53. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008;88(2):557-79.
54. Stewart SA, Weinberg RA. Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene*. 2002;21(4):627-30.
55. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:177-208.
56. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-10.
57. Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem*. 2004;279(49):51338-42.
58. Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:161-7.
59. Feng X, Hsu SJ, Kasbek C, Chaiken M, Price CM. CTC1-mediated C-strand fill-in is an essential step in telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(8):4281-93.
60. Bhattacharjee A, Wang Y, Diao J, Price CM. Dynamic DNA binding, junction recognition and G4 melting activity underlie the telomeric and genome-wide roles of human CST. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(21):12311-24.
61. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. 2007;318(5851):798-801.
62. Pfeiffer V, Lingner J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002747.
63. Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):567-74.
64. HAYFLICK L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
65. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*. 1998;58(18):4168-72.
66. Djojotubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells*. 2003;15(2):164-75.

67. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):611-22.
68. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet.* 2001;28(2):155-9.
69. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 1995;155(8):3711-5.
70. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells.* 1996;14(2):239-48.
71. Savage SA. Human telomeres and telomere biology disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:41-66.
72. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):72-6.
73. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-5.
74. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 1997;90(4):785-95.
75. González-Suárez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet.* 2000;26(1):114-7.
76. Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(16):5021-7.
77. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* 1997;3(11):1271-4.
78. Serakinci N, Ergoren M. Mesenchymal Stem Cells in Cancer Therapy 2015. 337-60 p.
79. De Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:197-204.
80. Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(6):364-78.
81. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):693-704.
82. Hu H, Zhang Y, Zou M, Yang S, Liang XQ. Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(9):1407-14.
83. Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Over-expression of telomere binding factors (TRF1 & TRF2) in renal cell carcinoma and their inhibition by using siRNA induce apoptosis, reduce cell proliferation and migration invitro. *PLoS One.* 2015;10(3):e0115651.
84. Butler KS, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK. Coordinate regulation between expression levels of telomere-binding proteins and telomere length in breast carcinomas. *Cancer Med.* 2012;1(2):165-75.
85. Oh BK, Kim YJ, Park C, Park YN. Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to telomere shortening during human multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 2005;166(1):73-80.
86. Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaugg AJ, Leinwand LA, Cech TR. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature.* 2012;492(7428):285-9.
87. Sexton AN, Youmans DT, Collins K. Specificity requirements for human telomere protein interaction with telomerase holoenzyme. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34455-64.

88. Zhong FL, Batista LF, Freund A, Pech MF, Venteicher AS, Artandi SE. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell*. 2012;150(3):481-94.
89. Nakashima M, Nandakumar J, Sullivan KD, Espinosa JM, Cech TR. Inhibition of telomerase recruitment and cancer cell death. *J Biol Chem*. 2013;288(46):33171-80.
90. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, Martínez-Trillos A, Villamor N, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(5):526-30.
91. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, Aoude LG, Quesada V, Ding Z, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):478-81.
92. Shi J, Yang XR, Ballew B, Rotunno M, Calista D, Fagnoli MC, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):482-6.
93. Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, Bertuch AA, Jhangiani SN, Doddapaneni H, et al. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(1):384.
94. Martínez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(9):504-15.
95. Patel TN, Vasan R, Gupta D, Patel J, Trivedi M. Shelterin proteins and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(8):3085-90.
96. García-Beccaria M, Martínez P, Méndez-Pertuz M, Martínez S, Blanco-Aparicio C, Cañamero M, et al. Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage. *EMBO Mol Med*. 2015;7(7):930-49.
97. Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet*. 2008;82(2):501-9.
98. Chen LY, Zhang Y, Zhang Q, Li H, Luo Z, Fang H, et al. Mitochondrial localization of telomeric protein TIN2 links telomere regulation to metabolic control. *Mol Cell*. 2012;47(6):839-50.
99. Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, de Lange T. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J*. 2005;24(14):2667-78.
100. Davoli T, Denchi EL, de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 2010;141(1):81-93.
101. Takai KK, Kibe T, Donigian JR, Frescas D, de Lange T. Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Mol Cell*. 2011;44(4):647-59.
102. Li X, Liu W, Wang H, Yang L, Li Y, Wen H, et al. Rap1 is indispensable for TRF2 function in etoposide-induced DNA damage response in gastric cancer cell line. *Oncogenesis*. 2015;4:e144.
103. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):171-81.
104. Wang F, Stewart J, Price CM. Human CST abundance determines recovery from diverse forms of DNA damage and replication stress. *Cell Cycle*. 2014;13(22):3488-98.
105. Chen LY, Majerská J, Lingner J. Molecular basis of telomere syndrome caused by CTC1 mutations. *Genes Dev*. 2013;27(19):2099-108.
106. Huang C, Jia P, Chastain M, Shiva O, Chai W. The human CTC1/STN1/TEN1 complex regulates telomere maintenance in ALT cancer cells. *Exp Cell Res*. 2017;355(2):95-104.
107. Chang KV, Chen YC, Wu WT, Shen HJ, Huang KC, Chu HP, et al. Expression of Telomeric Repeat-Containing RNA Decreases in Sarcopenia and Increases after Exercise and Nutrition Intervention. *Nutrients*. 2020;12(12).



108. Cusanelli E, Chartrand P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Front Genet.* 2015;6:143.
109. Graham MK, Meeker A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat Rev Urol.* 2017;14(10):607-19.
110. Kruk PA, Rampino NJ, Bohr VA. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(1):258-62.
111. Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology.* 2007;39(3):299-304.
112. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256-69.
113. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology.* 2012;60(1):199-215.
114. Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, et al. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4918-22.
115. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 1996;56(1):218-22.
116. Moehren U, Papaioannou M, Reeb CA, Grasselli A, Nanni S, Asim M, et al. Wild-type but not mutant androgen receptor inhibits expression of the hTERT telomerase subunit: a novel role of AR mutation for prostate cancer development. *FASEB J.* 2008;22(4):1258-67.
117. Cho SD, Jiang C, Malewicz B, Dong Y, Young CY, Kang KS, et al. Methyl selenium metabolites decrease prostate-specific antigen expression by inducing protein degradation and suppressing androgen-stimulated transcription. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(5):605-11.
118. Kim SH, Richardson M, Chinnakannu K, Bai VU, Menon M, Barrack ER, et al. Androgen receptor interacts with telomeric proteins in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2010;285(14):10472-6.
119. Taheri M, Ghafouri-Fard S, Najafi S, Kallenbach J, Keramatfar E, Atri Roozbahani G, et al. Hormonal regulation of telomerase activity and hTERT expression in steroid-regulated tissues and cancer. *Cancer Cell Int.* 2022;22(1):258.
120. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 1999;21(2):220-4.
121. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000;28(3):669-77.
122. Meeker AK. Telomeres and telomerase in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer biology. *Urol Oncol.* 2006;24(2):122-30.
123. Abida W, Cyrta J, Heller G, Prandi D, Armenia J, Coleman I, et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(23):11428-36.
124. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.
125. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
126. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W98-W102.
127. Scheibe M, Arnoult N, Kappei D, Buchholz F, Decottignies A, Butter F, et al. Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res.* 2013;23(12):2149-57.
128. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.

129. Dahlgren PN, Bishop K, Dey S, Herbert BS, Tanaka H. Development of a New Monochrome Multiplex qPCR Method for Relative Telomere Length Measurement in Cancer. *Neoplasia*. 2018;20(5):425-31.
130. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36529-40.
131. Takayama KI. Splicing Factors Have an Essential Role in Prostate Cancer Progression and Androgen Receptor Signaling. *Biomolecules*. 2019;9(4).
132. Yuan X, Cai C, Chen S, Yu Z, Balk SP. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene*. 2014;33(22):2815-25.
133. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, et al. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res*. 2014;74(15):4145-56.
134. Chen W, He LN, Liang Y, Zeng X, Wu CP, Su MQ, et al. TERT1 downregulation promotes the migration and invasion of the PC3 prostate cancer cell line as a target of miR-155. *Mol Med Rep*. 2020;22(6):5209-18.
135. Dos Santos GA, Pimenta R, Viana NI, Guimarães VR, Romão P, Candido P, et al. Shorter leukocyte telomere length is associated with severity of COVID-19 infection. *Biochem Biophys Rep*. 2021;27:101056.
136. Wu Y, Poulos RC, Reddel RR. Role of POT1 in Human Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
137. Izgi A, Gunal A, Yalcin S, Gunduz U. Telomere 1 (POT1) gene expression and its association with telomerase activity in colorectal tumor samples with different pathological features. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(7):841-6.
138. Pal D, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Expression of Telomere Binding Proteins (RAP1 and POT1) in Renal Cell Carcinoma and Their Correlation with Clinicopathological Parameters. *Indian J Clin Biochem*. 2017;32(3):301-5.
139. Aljarbou F, Almousa N, Bazzi M, Aldaihan S, Alanazi M, Alharbi O, et al. The expression of telomere-related proteins and DNA damage response and their association with telomere length in colorectal cancer in Saudi patients. *PLoS One*. 2018;13(6):e0197154.
140. Lee JE, Oh BK, Choi J, Park YN. Telomeric 3' overhangs in chronic HBV-related hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;123(2):264-72.
141. Panero J, Stanganelli C, Arbelbide J, Fantl DB, Kohan D, García Rivello H, et al. Expression profile of shelterin components in plasma cell disorders. Clinical significance of POT1 overexpression. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52(2-3):134-9.
142. Panero J, Alves-Paiva RM, Roisman A, Santana-Lemos BA, Falcão RP, Oliveira G, et al. Acquired TERT promoter mutations stimulate TERT transcription in mantle cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2016;91(5):481-5.
143. Salhab M, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. The expression of gene transcripts of telomere-associated genes in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters and clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):35-46.
144. Kondo T, Oue N, Yoshida K, Mitani Y, Naka K, Nakayama H, et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2004;64(2):523-9.
145. Fujii K, Sasahira T, Moriwaka Y, Oue N, Yasui W, Kuniyasu H. Protection of telomeres 1 protein levels are associated with telomere length in gastric cancer. *Int J Mol Med*. 2008;21(5):599-604.
146. Gao J, Zhang J, Long Y, Lu X. Expression of telomere binding proteins in gastric cancer and correlation with clinicopathological parameters. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2011;7(4):339-45.
147. Gong Y, Stock AJ, Liu Y. The enigma of excessively long telomeres in cancer: lessons learned from rare human POT1 variants. *Curr Opin Genet Dev*. 2020;60:48-55.

148. Glousker G, Briod AS, Quadroni M, Lingner J. Human shelterin protein POT1 prevents severe telomere instability induced by homology-directed DNA repair. *EMBO J*. 2020;39(23):e104500.
149. Gu P, Wang Y, Bisht KK, Wu L, Kukova L, Smith EM, et al. Pot1 OB-fold mutations unleash telomere instability to initiate tumorigenesis. *Oncogene*. 2017;36(14):1939-51.
150. Rafiei S, Fitzpatrick K, Liu D, Cai MY, Elmarakeby HA, Park J, et al. Loss Confers Greater Sensitivity to ATR Inhibition Than PARP Inhibition in Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(11):2094-100.
151. Shi R, Zhao Z, Zhou H, Wei M, Ma WL, Zhou JY, et al. Reduced expression of PinX1 correlates to progressive features in patients with prostate cancer. *Cancer Cell Int*. 2014;14:46.
152. Rubin MA, Varambally S, Beroukhim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, et al. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Res*. 2004;64(11):3814-22.
153. Nupponen NN, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, et al. Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1777-83.
154. Nupponen NN, Isola J, Visakorpi T. Mapping the amplification of EIF3S3 in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28(2):203-10.
155. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2011;65(11):1180-92.
156. Bejarano L, Bosso G, Louzame J, Serrano R, Gomez-Casero E, Martinez-Torrecedrada J, et al. Multiple cancer pathways regulate telomere protection. *EMBO Mol Med*. 2019;11(7):e10292.
157. Bejarano L, Schuhmacher AJ, Méndez M, Megías D, Blanco-Aparicio C, Martínez S, et al. Inhibition of TRF1 Telomere Protein Impairs Tumor Initiation and Progression in Glioblastoma Mouse Models and Patient-Derived Xenografts. *Cancer Cell*. 2017;32(5):590-607.e4.
158. Bejarano L, Louzame J, Montero JJ, Megías D, Flores JM, Blasco MA. Safety of Whole-Body Abrogation of the TRF1 Shelterin Protein in Wild-Type and Cancer-Prone Mouse Models. *iScience*. 2019;19:572-85.
159. Gay-Bellile M, Romero P, Cayre A, Veronese L, Privat M, Singh S, et al. ERCC1 and telomere status in breast tumours treated with neoadjuvant chemotherapy and their association with patient prognosis. *J Pathol Clin Res*. 2016;2(4):234-46.
160. Li Z, Yang X, Xia N, Yang L, Yu H, Zhou F, et al. PTPN22 and TRF1 help enhance the radio resistance in breast cancer cell. *Cancer cell international*. 2014;14(1):7.
161. Chen W, Wang Y, Li F, Lin W, Liang Y, Ma Z. Expression of Telomere Repeat Binding Factor 1 and TRF2 in Prostate Cancer and Correlation with Clinical Parameters. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9764752.
162. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol*. 2019;30(1):44-56.
163. Vukovic B, Beheshti B, Park P, Lim G, Bayani J, Zielenska M, et al. Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res*. 2007;116(1-2):1-11.
164. Dos Santos GA, Viana NI, Pimenta R, Guimarães VR, de Camargo JA, Romão P, et al. Prognostic value of TRF1 expression in prostate cancer. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2021;33(1):24.
165. Rangel-Pozzo A, Liu S, Wajnberg G, Wang X, Ouellette RJ, Hicks GG, et al. Genomic Analysis of Localized High-Risk Prostate Cancer Circulating Tumor Cells at the Single-Cell Level. *Cells*. 2020;9(8).
166. Wu J, Crowe DL. Telomere DNA Damage Signaling Regulates Prostate Cancer Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2020;18(9):1326-39.

167. Nera B, Huang HS, Lai T, Xu L. Elevated levels of TRF2 induce telomeric ultrafine anaphase bridges and rapid telomere deletions. *Nat Commun.* 2015;6:10132.
168. Carter HB, Helfand B, Mamawala M, Wu Y, Landis P, Yu H, et al. Germline Mutations in ATM and BRCA1/2 Are Associated with Grade Reclassification in Men on Active Surveillance for Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2019;75(5):743-9.
169. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell.* 2015;161(5):1215-28.
170. Arora K, Barbieri CE. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(8):58.
171. Mukherjee AK, Sharma S, Bagri S, Kutum R, Kumar P, Hussain A, et al. Telomere repeat-binding factor 2 binds extensively to extra-telomeric G-quadruplexes and regulates the epigenetic status of several gene promoters. *J Biol Chem.* 2019;294(47):17709-22.
172. Saha A, Roy S, Kar M, Thakur S, Padhi S, Akhter Y, et al. Role of Telomeric TRF2 in Orosphere Formation and CSC Phenotype Maintenance Through Efficient DNA Repair Pathway and its Correlation with Recurrence in OSCC. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14(6):871-87.
173. Tu L, Huda N, Grimes BR, Slee RB, Bates AM, Cheng L, et al. Widespread telomere instability in prostatic lesions. *Mol Carcinog.* 2016;55(5):842-52.
174. Rane JK, Greener S, Frame FM, Mann VM, Simms MS, Collins AT, et al. Telomerase Activity and Telomere Length in Human Benign Prostatic Hyperplasia Stem-like Cells and Their Progeny Implies the Existence of Distinct Basal and Luminal Cell Lineages. *Eur Urol.* 2016;69(4):551-4.
175. Li J, Chang J, Tian J, Ke J, Zhu Y, Yang Y, et al. A Rare Variant P507L in TPP1 Interrupts TPP1-TIN2 Interaction, Influences Telomere Length, and Confers Colorectal Cancer Risk in Chinese Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(9):1029-35.
176. Polito F, Cucinotta M, Abbritti RV, Brogna A, Pergolizzi S, Tomasello C, et al. Silencing of telomere-binding protein adrenocortical dysplasia (ACD) homolog enhances radiosensitivity in glioblastoma cells. *Transl Res.* 2018;202:99-108.
177. Yang L, Wang W, Hu L, Yang X, Zhong J, Li Z, et al. Telomere-binding protein TPP1 modulates telomere homeostasis and confers radioresistance to human colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(11):e81034.
178. Qiang W, Wu Q, Zhou F, Xie C, Wu C, Zhou Y. Suppression of telomere-binding protein TPP1 resulted in telomere dysfunction and enhanced radiation sensitivity in telomerase-negative osteosarcoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(2):363-8.
179. Zhu J, Liu W, Chen C, Zhang H, Yue D, Li C, et al. TPP1 OB-fold domain protein suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by inhibiting telomerase recruitment to telomeres in human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(6):1509-19.
180. Aramburu T, Plucinsky S, Skordalakes E. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:1939-46.
181. Kim SH, Davalos AR, Heo SJ, Rodier F, Zou Y, Beausejour C, et al. Telomere dysfunction and cell survival: roles for distinct TIN2-containing complexes. *J Cell Biol.* 2008;181(3):447-60.
182. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol.* 2015;4(3):365-80.
183. Lin CY, Jan YJ, Kuo LK, Wang BJ, Huo C, Jiang SS, et al. Elevation of androgen receptor promotes prostate cancer metastasis by induction of epithelial-mesenchymal transition and reduction of KAT5. *Cancer Sci.* 2018;109(11):3564-74.
184. Giatromanolaki A, Fasoulaki V, Kalamida D, Mitrakas A, Kakouratos C, Lialiaris T, et al. CYP17A1 and Androgen-Receptor Expression in Prostate Carcinoma Tissues and Cancer Cell Lines. *Curr Urol.* 2019;13(3):157-65.
185. Ding CL, Qian CL, Qi ZT, Wang W. Identification of retinoid acid induced 16 as a novel androgen receptor target in prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;506:110745.
186. Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet.* 2016;53(1):1-14.

187. Poncet D, Belleville A, t'kint de Roodenbeke C, Roborel de Climens A, Ben Simon E, Merle-Beral H, et al. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(4):2388-91.
188. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(3):161-76.
189. Khattar E, Maung KZY, Chew CL, Ghosh A, Mok MMH, Lee P, et al. Rap1 regulates hematopoietic stem cell survival and affects oncogenesis and response to chemotherapy. *Nat Commun*. 2019;10(1):5349.
190. Xiao L, Lan X, Shi X, Zhao K, Wang D, Wang X, et al. Cytoplasmic RAP1 mediates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):e2803.
191. Martínez P, Thanasoula M, Carlos AR, Gómez-López G, Tejera AM, Schoeftner S, et al. Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat Cell Biol*. 2010;12(8):768-80.
192. Kim W, Shay JW. Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation*. 2018;99:1-9.
193. Arantes Dos Santos G, Viana NI, Pimenta R, Reis ST, Ramos Moreira Leite K, Srougi M. Hypothesis: The triad androgen receptor, zinc finger proteins and telomeres modulates the global gene expression pattern during prostate cancer progression. *Med Hypotheses*. 2021;150:110566.
194. Cai Y, Kandula V, Kosuru R, Ye X, Irwin MG, Xia Z. Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy. *Cell Cycle*. 2017;16(19):1765-73.
195. Martínez P, Gómez-López G, García F, Mercken E, Mitchell S, Flores JM, et al. RAP1 protects from obesity through its extratelomeric role regulating gene expression. *Cell Rep*. 2013;3(6):2059-74.
196. Bandini M, Gandaglia G, Briganti A. Obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2017;27(5):415-21.
197. Pelton K, Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(6):751-9.
198. Pimenta R, Camargo JA, Candido P, Ghazarian V, Gonçalves GL, Guimarães VR, et al. Cholesterol Triggers Nuclear Co-Association of Androgen Receptor, p160 Steroid Coactivators, and p300/CBP-Associated Factor Leading to Androgenic Axis Transactivation in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2022;56(S4):1-15.
199. Joshu CE, Heaphy CM, Barber JR, Lu J, Zarinshenas R, Davis C, et al. Obesity is associated with shorter telomere length in prostate stromal cells in men with aggressive prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2020.
200. Stoehr R, Taubert H, Zinnall U, Giedl J, Gaisa NT, Burger M, et al. Frequency of TERT Promoter Mutations in Prostate Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(2):53-7.
201. Sabaliauskaite R, Jarmalaite S, Petroska D, Dasevicius D, Laurinavicius A, Jankevicius F, et al. Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):781-91.
202. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaría J, Aliño SF, Dasí F. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12 Suppl 1:S69-77.
203. Iczkowski KA, Pantazis CG, McGregor DH, Wu Y, Tawfik OW. Telomerase reverse transcriptase subunit immunoreactivity: a marker for high-grade prostate carcinoma. *Cancer*. 2002;95(12):2487-93.
204. Goldkorn A, Ely B, Tangen CM, Tai YC, Xu T, Li H, et al. Circulating tumor cell telomerase activity as a prognostic marker for overall survival in SWOG 0421: a phase III metastatic castration resistant prostate cancer trial. *Int J Cancer*. 2015;136(8):1856-62.

205. Poos AM, Schroeder C, Jaishankar N, Röhl D, Oswald M, Meiners J, et al. PITX1 Is a Regulator of TERT Expression in Prostate Cancer with Prognostic Power. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5).
206. Gasinska A, Luczynska E, Wilk W, Cichocka A. Differences in the expression of telomerase and prostate-specific membrane antigen in non-advanced prostatic cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013;51(1):66-72.
207. Gasinska A, Jaszczynski J, Rychlik U, Łuczynska E, Pogodzinski M, Palaczynski M. Prognostic Significance of Serum PSA Level and Telomerase, VEGF and GLUT-1 Protein Expression for the Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(2):1049-56.
208. Jacob S, Nayak S, Kakar R, Chaudhari UK, Joshi D, Vundinti BR, et al. A triad of telomerase, androgen receptor and early growth response 1 in prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2016;17(4):439-48.
209. Ségal-Bendirdjian E, Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:332.
210. Baena-Del Valle JA, Zheng Q, Esopi DM, Rubenstein M, Hubbard GK, Moncaliano MC, et al. MYC drives overexpression of telomerase RNA (hTR/TERC) in prostate cancer. *J Pathol*. 2018;244(1):11-24.
211. Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, Bartlett JM. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(14):5271-81.
212. He Q, Liu Y, Sun W. Statistical analysis of non-coding RNA data. *Cancer Lett*. 2018;417:161-7.
213. Cao Y, Bryan TM, Reddel RR. Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1092-9.
214. Yuan X, Dai M, Xu D. Telomere-related Markers for Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(6):410-32.
215. Bantis A, Patsouris E, Gonidi M, Kavantzias N, Tsipis A, Athanassiadou AM, et al. Telomerase RNA expression and DNA ploidy as prognostic markers of prostate carcinomas. *Tumori*. 2009;95(6):744-52.
216. Zheng Q, Liu P, Gao G, Yuan J, Wang P, Huang J, et al. Mitochondrion-processed TERC regulates senescence without affecting telomerase activities. *Protein Cell*. 2019;10(9):631-48.
217. Liu H, Yang Y, Ge Y, Liu J, Zhao Y. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(15):8084-95.
218. Tijhuis AE, Johnson SC, McClelland SE. The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. *Mol Cytogenet*. 2019;12:17.
219. Desler C, Munch-Petersen B, Stevnsner T, Matsui S, Kulawiec M, Singh KK, et al. Mitochondria as determinant of nucleotide pools and chromosomal stability. *Mutat Res*. 2007;625(1-2):112-24.
220. Miller ET, You S, Cadaneanu RM, Kim M, Yoon J, Liu ST, et al. Chromosomal instability in untreated primary prostate cancer as an indicator of metastatic potential. *BMC Cancer*. 2020;20(1):398.
221. Pecqueux C, Arslan A, Heller M, Falkenstein M, Kaczorowski A, Tolstov Y, et al. FGF-2 is a driving force for chromosomal instability and a stromal factor associated with adverse clinico-pathological features in prostate cancer. *Urol Oncol*. 2018;36(8):365.e15-.e26.
222. Graham MK, Kim J, Da J, Brosnan-Cashman JA, Rizzo A, Baena Del Valle JA, et al. Functional Loss of. *Mol Cancer Res*. 2019;17(12):2480-91.
223. Williams SC. No end in sight for telomerase-targeted cancer drugs. *Nat Med*. 2013;19(1):6.
224. Gecgel KK, Muduroglu M, Erdogan S. Inhibition of telomerase potentiates enzalutamide efficiency of androgen-sensitive human prostate cancer cells. *J BUON*. 2017;22(6):1570-6.

225. Kaewtunjai N, Summart R, Wongnoppavich A, Lojanapiwat B, Lee TR, Tuntiwechapikul W. Telomerase Inhibition, Telomere Shortening, and Cellular Uptake of the Perylene Derivatives PM2 and PIPER in Prostate Cancer Cells. *Biol Pharm Bull.* 2019;42(6):906-14.
226. Marian CO, Wright WE, Shay JW. The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells. *Int J Cancer.* 2010;127(2):321-31.
227. Stewart JA, Wang Y, Ackerson SM, Schuck PL. Emerging roles of CST in maintaining genome stability and human disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018;23:1564-86.
228. Kim B, Yun W, Lee ST, Choi JR, Yoo KH, Koo HH, et al. Prevalence and clinical implications of germline predisposition gene mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Sci Rep.* 2020;10(1):14297.
229. Shen W, Kerr CM, Przychozen B, Mahfouz RZ, LaFramboise T, Nagata Y, et al. Impact of germline CTC1 alterations on telomere length in acquired bone marrow failure. *Br J Haematol.* 2019;185(5):935-9.
230. Luo YM, Xia NX, Yang L, Li Z, Yang H, Yu HJ, et al. CTC1 increases the radioresistance of human melanoma cells by inhibiting telomere shortening and apoptosis. *Int J Mol Med.* 2014;33(6):1484-90.
231. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):108-16.
232. Amir M, Khan P, Queen A, Dohare R, Alajmi MF, Hussain A, et al. Structural Features of Nucleoprotein CST/Shelterin Complex Involved in the Telomere Maintenance and Its Association with Disease Mutations. *Cells.* 2020;9(2).
233. Feng X, Hsu SJ, Bhattacharjee A, Wang Y, Diao J, Price CM. CTC1-STN1 terminates telomerase while STN1-TEN1 enables C-strand synthesis during telomere replication in colon cancer cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):2827.
234. Gu P, Jia S, Takasugi T, Smith E, Nandakumar J, Hendrickson E, et al. CTC1-STN1 coordinates G- and C-strand synthesis to regulate telomere length. *Aging Cell.* 2018;17(4):e12783.
235. Campa D, Matarazzi M, Greenhalf W, Bijlsma M, Saum KU, Pasquali C, et al. Genetic determinants of telomere length and risk of pancreatic cancer: A PANDORA study. *Int J Cancer.* 2019;144(6):1275-83.
236. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422-7, 7e1-2.
237. Wang S, Chang E, Byanyima P, Huang P, Sanyu I, Musisi E, et al. Association between common telomere length genetic variants and telomere length in an African population and impacts of HIV and TB. *J Hum Genet.* 2019;64(10):1033-40.
238. Kuo CL, Pilling LC, Kuchel GA, Ferrucci L, Melzer D. Telomere length and aging-related outcomes in humans: A Mendelian randomization study in 261,000 older participants. *Aging Cell.* 2019;18(6):e13017.
239. Han P, Dang Z, Shen Z, Dai H, Bai Y, Li B, et al. Association of SNPs in the OBFC1 gene and laryngeal carcinoma in Chinese Han male population. *Int J Clin Oncol.* 2019;24(9):1042-8.
240. Phelan CM, Kuchenbaecker KB, Tyrer JP, Kar SP, Lawrenson K, Winham SJ, et al. Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer. *Nat Genet.* 2017;49(5):680-91.
241. Ganduri S, Lue NF. STN1-POLA2 interaction provides a basis for primase-pol  $\alpha$  stimulation by human STN1. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(16):9455-66.
242. Mirman Z, Lottersberger F, Takai H, Kibe T, Gong Y, Takai K, et al. 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol $\alpha$ -dependent fill-in. *Nature.* 2018;560(7716):112-6.
243. Zhou Q, Chai W. Suppression of STN1 enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in cancer cells by elevating DNA damage. *Oncol Lett.* 2016;12(2):800-8.

244. Holstein EM, Clark KR, Lydall D. Interplay between nonsense-mediated mRNA decay and DNA damage response pathways reveals that Stn1 and Ten1 are the key CST telomere-cap components. *Cell Rep.* 2014;7(4):1259-69.
245. Qian W, Wang J, Jin NN, Fu XH, Lin YC, Lin JJ, et al. Ten1p promotes the telomeric DNA-binding activity of Cdc13p: implication for its function in telomere length regulation. *Cell Res.* 2009;19(7):849-63.
246. Xu L, Petreaca RC, Gasparyan HJ, Vu S, Nugent CI. TEN1 is essential for CDC13-mediated telomere capping. *Genetics.* 2009;183(3):793-810.
247. Kasbek C, Wang F, Price CM. Human TEN1 maintains telomere integrity and functions in genome-wide replication restart. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30139-50.
248. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* 2008;10(2):228-36.
249. Wang Z, Deng Z, Dahmane N, Tsai K, Wang P, Williams DR, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(46):E6293-300.
250. Kroupa M, Tomasova K, Kavec M, Skrobánek P, Buchler T, Kumar R, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA): Physiological functions and relevance in cancer. *Front Oncol.* 2022;12:913314.
251. Montero JJ, López de Silanes I, Graña O, Blasco MA. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. *Nat Commun.* 2016;7:12534.
252. Feretzaki M, Renck Nunes P, Lingner J. Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. *RNA.* 2019;25(11):1470-80.
253. Gala K, Khatat E. Long non-coding RNAs at work on telomeres: Functions and implications in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2021.
254. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5797-806.
255. Koskas S, Decottignies A, Dufour S, Pezet M, Verdell A, Vourc'h C, et al. Heat shock factor 1 promotes TERRA transcription and telomere protection upon heat stress. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(11):6321-33.
256. Galigniana NM, Charó NL, Uranga R, Cabanillas AM, Piwien-Pilipuk G. Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(4):118643.
257. Tutton S, Azzam GA, Stong N, Vladimirova O, Wiedmer A, Monteith JA, et al. Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J.* 2016;35(2):193-207.
258. Tsai RX, Fang KC, Yang PC, Hsieh YH, Chiang IT, Chen Y, et al. TERRA regulates DNA G-quadruplex formation and ATRX recruitment to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(21):12217-34.
259. Watson LA, Goldberg H, Bérubé NG. Emerging roles of ATRX in cancer. *Epigenomics.* 2015;7(8):1365-78.
260. Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR, Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(4):1152-9.
261. Storti CB, de Oliveira RA, de Carvalho M, Hasimoto EN, Cataneo DC, Cataneo AJM, et al. Telomere-associated genes and telomeric lncRNAs are biomarker candidates in lung squamous cell carcinoma (LUSC). *Exp Mol Pathol.* 2020;112:104354.
262. Vitelli V, Falvo P, G Nergadze S, Santagostino M, Khoraiuli L, Pellanda P, et al. Telomeric Repeat-Containing RNAs (TERRA) Decrease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Is Associated with Worsened Clinical Outcome. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1).
263. Bae SU, Park WJ, Jeong WK, Baek SK, Lee HW, Lee JH. Prognostic impact of telomeric repeat-containing RNA expression on long-term oncologic outcomes in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(14):e14932.



264. Fogli A, Demattei MV, Corset L, Vaurs-Barrière C, Chautard E, Biau J, et al. Detection of the alternative lengthening of telomeres pathway in malignant gliomas for improved molecular diagnosis. *J Neurooncol.* 2017;135(2):381-90.
265. Herrmann M, Pusceddu I, März W, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(8):1210-22.
266. Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, et al. Determinants of telomere length across human tissues. *Science.* 2020;369(6509).
267. Haycock PC, Burgess S, Nounu A, Zheng J, Okoli GN, Bowden J, et al. Association Between Telomere Length and Risk of Cancer and Non-Neoplastic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(5):636-51.
268. Julin B, Shui I, Heaphy CM, Joshu CE, Meeker AK, Giovannucci E, et al. Circulating leukocyte telomere length and risk of overall and aggressive prostate cancer. *Br J Cancer.* 2015;112(4):769-76.
269. Gao Y, Wei Y, Zhou X, Huang S, Zhao H, Zeng P. Assessing the Relationship Between Leukocyte Telomere Length and Cancer Risk/Mortality in UK Biobank and TCGA Datasets With the Genetic Risk Score and Mendelian Randomization Approaches. *Front Genet.* 2020;11:583106.
270. Hurwitz LM, Heaphy CM, Joshu CE, Isaacs WB, Konishi Y, De Marzo AM, et al. Telomere length as a risk factor for hereditary prostate cancer. *Prostate.* 2014;74(4):359-64.
271. Gu CY, Jin SM, Qin XJ, Zhu Y, Bo D, Lin GW, et al. Genetic variants in. *J Cancer.* 2019;10(24):6170-4.
272. Renner W, Krenn-Pilko S, Gruber HJ, Herrmann M, Langsenlehner T. Relative telomere length and prostate cancer mortality. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018;21(4):579-83.
273. Svenson U, Roos G, Wikström P. Long leukocyte telomere length in prostate cancer patients at diagnosis is associated with poor metastasis-free and cancer-specific survival. *Tumour Biol.* 2017;39(2):1010428317692236.
274. Tsai CW, Chang WS, Xu J, Xu Y, Huang M, Pettaway C, et al. Leukocyte telomere length is associated with aggressive prostate cancer in localized African American prostate cancer patients. *Carcinogenesis.* 2020;41(9):1213-8.
275. Xu J, Chang WS, Tsai CW, Bau DT, Xu Y, Davis JW, et al. Leukocyte telomere length is associated with aggressive prostate cancer in localized prostate cancer patients. *EBioMedicine.* 2020;52:102616.
276. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1741).
277. Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, et al. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2002;62(22):6405-9.
278. Livingstone J, Shiah YJ, Yamaguchi TN, Heisler LE, Huang V, Lesurf R, et al. The telomere length landscape of prostate cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):6893.
279. Fordyce CA, Heaphy CM, Joste NE, Smith AY, Hunt WC, Griffith JK. Association between cancer-free survival and telomere DNA content in prostate tumors. *J Urol.* 2005;173(2):610-4.
280. Treat EG, Heaphy CM, Massie LW, Bisoffi M, Smith AY, Davis MS, et al. Telomere DNA content in prostate biopsies predicts early rise in prostate-specific antigen after radical prostatectomy for prostate cancer. *Urology.* 2010;75(3):724-9.
281. Heaphy CM, Yoon GS, Peskoe SB, Joshu CE, Lee TK, Giovannucci E, et al. Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. *Cancer Discov.* 2013;3(10):1130-41.
282. De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).

283. Heaphy CM, Joshu CE, Barber JR, Davis C, Lu J, Zarinshenas R, et al. The prostate tissue-based telomere biomarker as a prognostic tool for metastasis and death from prostate cancer after prostatectomy. *J Pathol Clin Res.* 2022;8(5):481-91.
284. Mazzolini R, González N, Garcia-Garijo A, Millanes-Romero A, Peiró S, Smith S, et al. Snail1 transcription factor controls telomere transcription and integrity. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(1):146-58.
285. Baydar DE, Ozen H, Geyik PO, Gurel B. Can telomere alterations predict biochemical recurrence in prostate adenocarcinoma? A preliminary study. *Pathol Res Pract.* 2010;206(10):700-4.
286. Heaphy CM, Haffner MC, Graham MK, Lim D, Davis C, Corey E, et al. Telomere lengths differ significantly between small-cell neuroendocrine prostate carcinoma and adenocarcinoma of the prostate. *Hum Pathol.* 2020;101:70-9.
287. Rybicki BA, Sadasivan SM, Chen Y, Loveless I, Gupta NS, Chitale DA, et al. Race Differences in Telomere Length in Benign Prostate Biopsies and Subsequent Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2022;31(5):991-8.
288. Luo Z, Liu W, Sun P, Wang F, Feng X. Pan-cancer analyses reveal regulation and clinical outcome association of the shelterin complex in cancer. *Brief Bioinform.* 2021.
289. Wang L, Ma T, Liu W, Li H, Luo Z, Feng X. Pan-Cancer Analyses Identify the CTC1-STN1-TEN1 Complex as a Protective Factor and Predictive Biomarker for Immune Checkpoint Blockade in Cancer. *Front Genet.* 2022;13:859617.
290. Dos Santos GA, Viana NI, Pimenta R, de Camargo JA, Guimaraes VR, Romão P, et al. Pan-cancer analysis reveals that CTC1-STN1-TEN1 (CST) complex may have a key position in oncology. *Cancer Genet.* 2022;262-263:80-90.