



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA CLÍNICA E BANCO DE SANGUE- ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA (AC&T)

“Perfil de expressão de TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*) e sua correlação com o desequilíbrio telomérico em indivíduos com leucemia mielóide aguda (LMA)”

Aluno:
Leonardo Campos Zanelatto

São José do Rio Preto
2017

Trabalho de conclusão de curso

“Perfil de expressão de TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*) e sua correlação com o desequilíbrio telomérico em indivíduos com leucemia mielóide aguda (LMA)”

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Hematologia clínica e Banco de sangue da Academia de Ciência e Tecnologia (AC&T)

Aluno: *Leonardo Campos Zanelatto*

Ribeirão Preto
2017

Resumo

Telômeros são importantes estruturas que possuem como função proteger as extremidades dos cromossomos e manter a integridade genômica. Mutações constitutivas que reduzem severamente a capacidade de alongação dos telômeros pela telomerase podem tornar o seu reparo defeituoso e, conseqüentemente, causar um desgaste telomérico acelerado, facilitando o surgimento de diversas doenças, como o câncer.

O RNA não-codificante TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*, transcrito a partir da região subtelomérica dos cromossomos, parece estar relacionado à atividade da telomerase e à regulação do comprimento telomérico, fazendo-nos questionar o papel que TERRA pode desempenhar na etiologia de algumas doenças onco-hematológicas, como leucemias agudas. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar os perfis de expressão de TERRA em leucemias mielóides agudas (LMAs) e sua correlação com o desequilíbrio telomérico nesta patologia.

Os resultados sugerem que há uma relação inversa entre o encurtamento telomérico crítico e a alta transcrição de TERRA presente nas LMAs. Ademais, a expressão de TERRA nesta patologia parece auxiliar na regulação positiva da expressão da telomerase (*TERT*), o que impediria a senescência e atuaria como mecanismo anti-apoptótico na resposta ao dano no DNA de células leucêmicas agudas, garantindo a manutenção e progressão da doença.

Desta forma, TERRA parece atuar como um importante modulador na etiologia das leucemias mielóides agudas, e poderia ser utilizado como um futuro “alvo terapêutico” nessa doença.

Palavras-chave: Telômero, TERRA, PCR em tempo-real, leucemias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	04
1.1. Distúrbios onco-hematológicos e biologia dos telômeros.....	07
1.2. TERRA (telomeric repeat containing RNA).....	09
1.3. TERRA e seu papel na regulação do comprimento telomérico.....	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Amostras.....	15
3.2. PCR quantitativo (qPCR) para a medição do comprimento telomérico.....	15
3.3. Extração de RNA e amplificação de TERRA por qRT-PCR.....	16
3.4. Extração de RNA e expressão de TERT e TRF2 por qRT-PCR.....	17
3.5. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Dados dos pacientes	19
4.2. Mensuração do comprimento telomérico.....	19
4.3. Expressão de TERRA por RT-qPCR.....	20
4.4. Expressão de TERT por RT-qPCR.....	23
4.5. Expressão de TRF2 por RT-qPCR.....	25
5. CONCLUSÃO	29
6. BIBLIOGRAFIA	30

1. Introdução

Desde meados da década de 1990, a biologia dos telômeros obteve grande interesse da comunidade científica a partir do consenso sobre a importância destas estruturas para a estabilidade do genoma e proliferação celular (HARLEY et al., 1990; O'SULLIVAN & KARLSEDER, 2010; STEWART et al., 2012).

Telômeros são estruturas nucleoproteicas localizadas na extremidade dos cromossomos lineares, formados por sequências de DNA repetidas *in tandem* e vinculados a um complexo de proteínas protetoras (denominado telossomo) (DE LANGE, 2009). Tal segmento protege a extremidade dos cromossomos contra a perda de material genético durante a mitose e previne a ativação de vias de sinalização de danos ao DNA sendo, portanto, essencial à estabilidade cromossômica (YOUNG, 2012).

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

O complexo multiproteico telossomo/shelterina (formado por TRF1, TRF2, TPP1, POT1, TIN2, e Rap1) funciona como um “escudo” na extremidade dos cromossomos, o qual evita que os telômeros sejam identificados como quebras de dupla-fita de DNA por exonucleases (CALADO, 2009). Juntos, ambos protegem o DNA e mantêm a integridade do genoma (DE LANGE, 2005; CALADO & YOUNG, 2008).

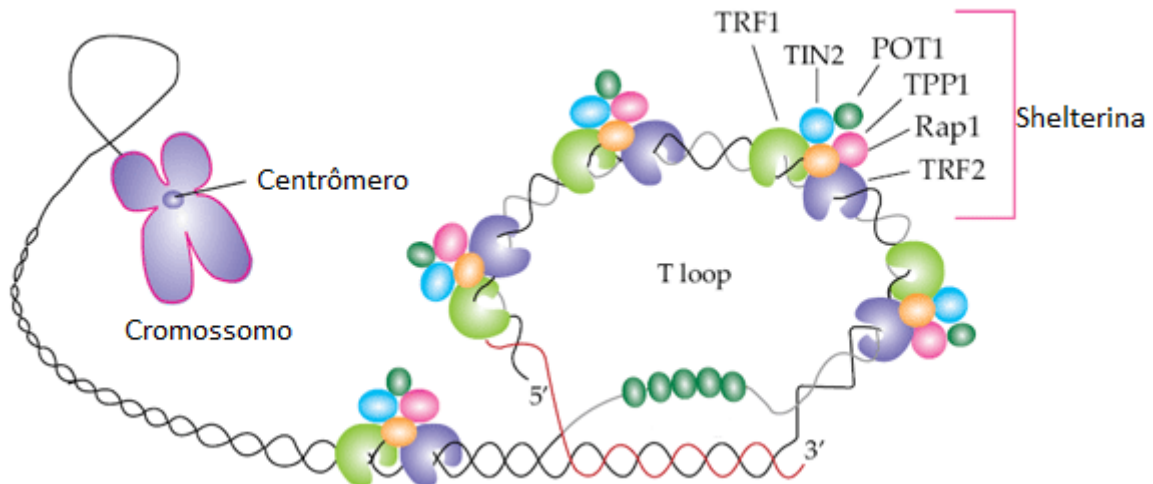


Figura 1- Representação esquemática da estrutura telomérica (adaptado de CALADO & YOUNG, 2008)

Apesar de todo este aparato protetor, a sequência telomérica na extremidade dos cromossomos encurta a cada divisão celular devido à incapacidade da DNA polimerase de replicar completamente a extremidade das sequências de DNA (CALADO & DUMITRIU, 2013). Este problema de “replicação das extremidades” eventualmente resulta em telômeros que atingem um comprimento criticamente curto. Por conseguinte, a parada do ciclo celular é desencadeada, o que leva à senescência celular ou à apoptose (SHAY & WRIGHT, 2011).

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

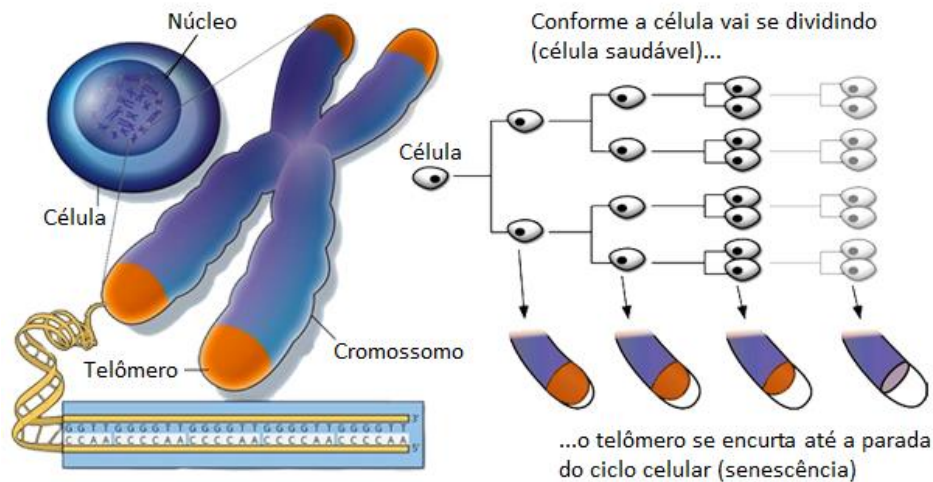


Figura 2- Esquema demonstrando o encurtamento telomérico durante as sucessivas divisões celulares (limite de Hayflick).

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

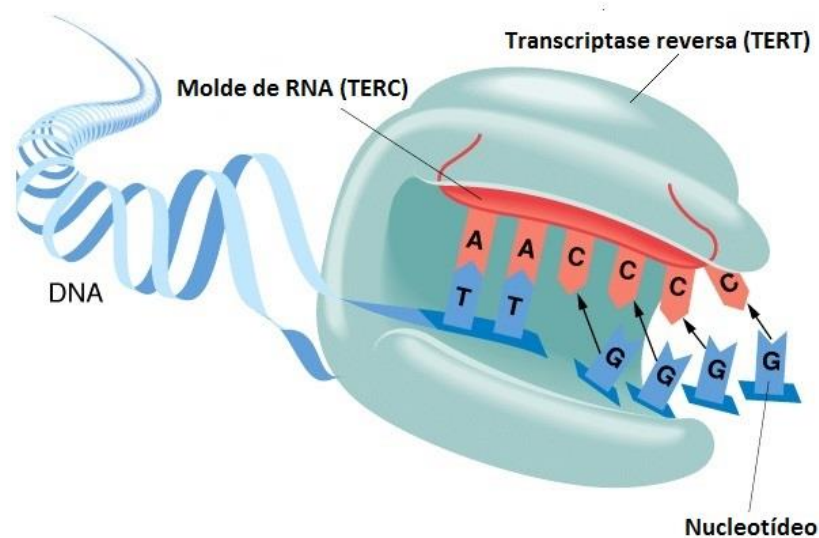


Figura 3- Representação da telomerase e seus constituintes (*TERT* e *TERC*).

A atividade da telomerase é cuidadosamente regulada em todos os tecidos e tipicamente expressa apenas durante a embriogênese. A partir do período neonatal, a atividade da mesma é largamente reprimida, exceto em certos órgãos altamente proliferativos, como a pele, intestino e medula óssea, que mantêm subpopulações de células-tronco. Este complexo enzimático também é superexpresso na maioria das células cancerosas, o que reflete a necessidade de manutenção do comprimento telomérico para o potencial proliferativo (SHAY & WRIGHT, 2011).

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

1.1. Distúrbios onco-hematológicos e biologia dos telômeros

Em contraste com a maioria das células somáticas que não possuem telomerase ativa, células hematopoiéticas normais expressam atividade de telomerase (BROCCOLI et al., 1995; COUNTER et al., 1995). No entanto, a presença de telomerase não implica necessariamente um comprimento telomérico estável e, portanto, imutável. De fato, os telômeros das células do sangue periférico e da medula óssea encurtam durante o envelhecimento replicativo natural (OHYASHIKI et al., 2002).

Esta perda gradual dos telômeros, resultado do envelhecimento e da ciclagem

rápida das células-tronco hematopoiéticas e linfócitos podem contribuir para a seleção de células anormais, e resultar em progressão maligna facilitada pela instabilidade genômica. Telômeros mais curtos e alta atividade da telomerase quase sempre se correlacionam com a gravidade da doença em neoplasias hematológicas, como leucemias, mielomas e linfomas (SVENSON & ROOS, 2009).

Em leucemias mielóides agudas (LMA) que possuem múltiplas aberrações cromossômicas, comumente encontra-se níveis elevados de atividade da telomerase e telômeros criticamente curtos, relacionados a um mau prognóstico da doença (SWIGGERS et al., 2006; EL BELBESY et al., 2015). De maneira semelhante, pacientes com mieloma múltiplo também apresentam telomerase ativa e comprimento telomérico curto associado a cariótipos anormais (WU et al., 2003; DEVILLE et al., 2009)

Ao contrário das leucemias agudas e mielomas, células hematopoiéticas de pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) expressam baixos níveis de telomerase. Isto significa que a erosão dos telômeros devido à rápida divisão celular não pode ser evitada na maioria das células da SMD. Esta perda da estabilidade telomérica pode induzir outras anormalidades genéticas que conduzem a outras mutações e à progressão da doença. Portanto, telômeros curtos e a baixa expressão de telomerase podem ser uma característica das células da SMD e de importância na patogênese da doença (GÜRKAN et al., 2005; WANG et al., 2014).

Recentemente, descobriu-se um novo componente relacionado à biologia dos telômeros, denominado “TERRA” (*telomeric repeat-containing RNA*) (AZZALIN et al., 2007). Este RNA não-codificante parece estar relacionado à regulação do comprimento telomérico, podendo desempenhar algum papel no desenvolvimento/evolução de neoplasias, como as leucemias (WANG et al., 2015). Porém, nenhum estudo avaliou até o presente momento a possível relação entre TERRA, o desequilíbrio da homeostase telomérica e as neoplasias hematológicas.

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

Durante muitos anos acreditou-se que as extremidades dos cromossomos, por estarem localizadas em uma região heterocromática e por possuírem uma baixa densidade gênica, fossem *loci* genômicos transcricionalmente inativos; entretanto, em 2007, Azzalin et al. demonstraram que os telômeros de mamíferos são, de fato, transcritos em longos RNAs não-codificantes, denominados TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*) (AZZALIN et al., 2007; WANG et al., 2015). Moléculas TERRA foram detectadas em uma variedade de organismos, incluindo levedura, peixe-zebra, rato e humanos, e acredita-se que participam ativamente dos mecanismos que regulam a homeostase e função dos telômeros (LUKE et al., 2008; SCHOEFTNER & BLASCO, 2010; CUSANELLI & CHARTRAND, 2015).

TERRAs são transcritos pela RNA polimerase II, a partir de vários *loci* na região subtelomérica em direção às extremidades dos cromossomos, consistindo de sequências de RNA subtelomérico seguido por repetições *in tandem* 5'-UUAGGG-3' (em vertebrados), com tamanhos que variam entre 100 até >9000 bases em mamíferos (AZZALIN et al., 2007; AZZALIN & LINGNER, 2015; WANG et al., 2015). Em humanos, a grande maioria do trato UUAGGG das moléculas TERRA possuem um comprimento aproximado de 200 bases, enquanto a maior parte da sequência de TERRA decorre da região subtelomérica, sendo sua heterogeneidade em grande parte devido a diferentes comprimentos desta parte do RNA (FEUERHAHN et al., 2010).

TERRA é expresso na maioria dos tecidos de mamíferos. Apenas cerca de 7 - 8% das moléculas TERRA humanas possuem um cauda poli(A), ao passo que a maior parte das moléculas de levedura são poliadeniladas, (AZZALIN & LINGNER, 2008; LUKE et al., 2008). Ainda não se sabe o motivo dessa diferença nas moléculas de TERRA (poliadenilada ou

não-poliadenilada), porém a maioria das moléculas poli(A)⁻ TERRA permanecem associadas aos telômeros e parecem ter um papel na manutenção de sua estrutura e facilitar sua replicação, enquanto as moléculas poli(A)⁺ TERRA ficam livres no nucleoplasma e não possuem função definida (Figura 4) (LUKE & LINGNER, 2009; FEUERHAHN et al., 2010).

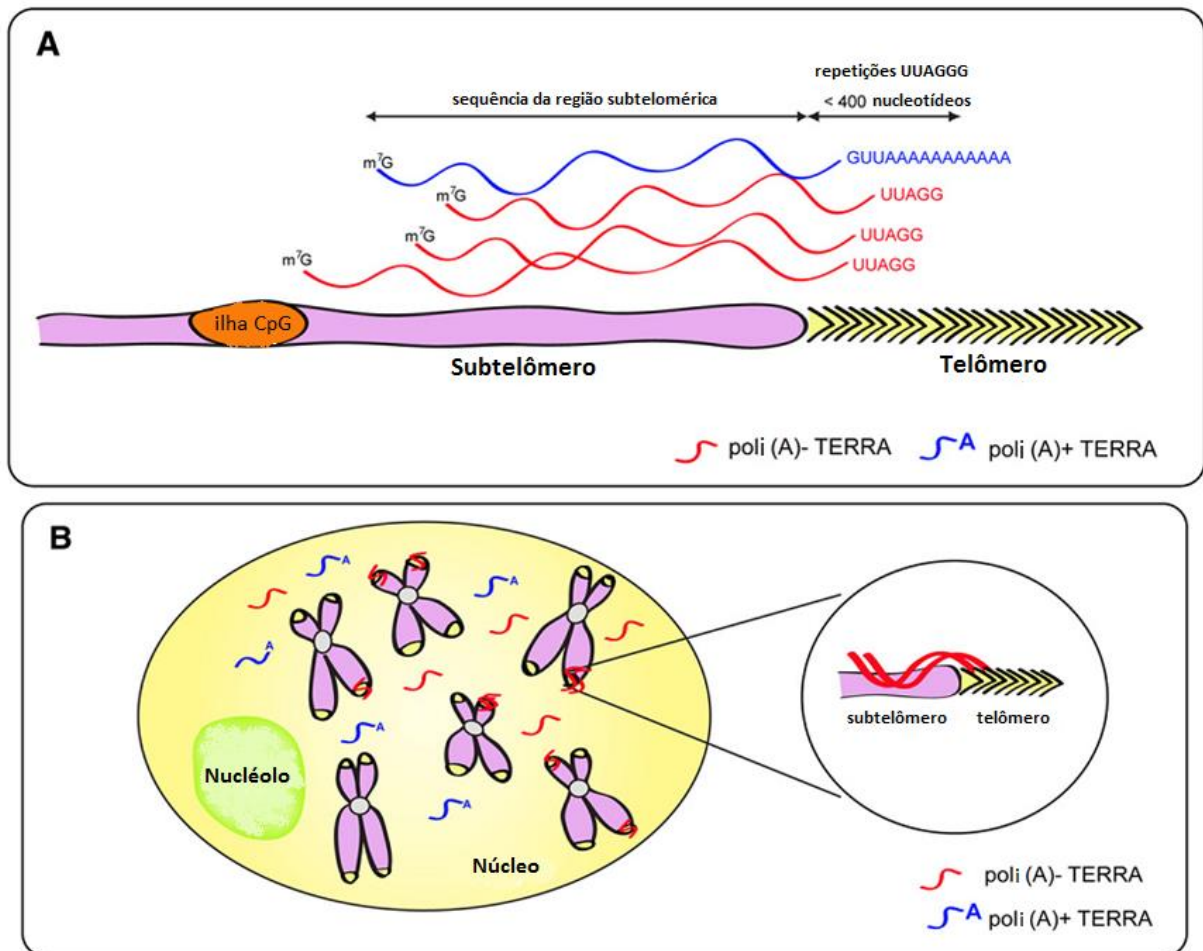


Figura 4- Biogênese e regulação de TERRA em mamíferos. (A) A transcrição de TERRA começa na região subteloamérica (a partir da região promotora, formada por ilhas CpG em alguns cromossomos) e procede em direção à extremidade 3' dos cromossomos. (B) Localização de TERRA: poli(A)⁺ TERRA é presente no nucleoplasma,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

Todas as moléculas TERRA humanas contêm um “cap” de 7-metilguanossina (m⁷G) em sua extremidade 5' (Figura 4a). Isto indica que as extremidades 5' de TERRA são definidas pela iniciação da transcrição, e não devido a eventos de processamento

pós-transcricionais (PORRO et al., 2010).

Alterações nos componentes do telossomo parecem também afetar os níveis de TERRA. A superexpressão de *TRF2* em células de camundongo resulta em encurtamento telomérico acompanhado por espaçamento nucleossomal aumentado. Apesar desta estrutura aberta da cromatina, uma diminuição nos níveis de TERRA é observada (BENETTI et al., 2008). Por outro lado, a depleção de *TRF2* leva a um aumento na transcrição de TERRA em um modo p53-dependente. Embora estes resultados pareçam apontar *TRF2* como um regulador negativo de TERRA, deve-se observar que a depleção de *TRF2* leva ao acúmulo de danos ao DNA nos telômeros, levantando a possibilidade de que a regulação positiva de TERRA pode ser parte de uma resposta celular fisiológica aos eventos de danos ao DNA telômero-específicos (CASLINI et al., 2009).

Outra característica interessante de TERRA está no controle de sua transcrição. Em humanos, dentro da região subtelomérica de pelo menos 20 subtelômeros (dos 46 que possuímos) existem sequências que partilham uma região conservada, contendo três diferentes intervalos de DNA repetitivos. O primeiro, mais próximo à região centromérica, contém repetições *in tandem* de 61 pares de base (pb). O segundo, um pouco mais distal, compreende repetições *in tandem* de 29 pb, seguido pelo terceiro, que possui repetições *in tandem* de 37 pb. A esta região convencionou-se o nome de “61-29-37 repeats” (Figura 5) (NERGADZE et al., 2009).

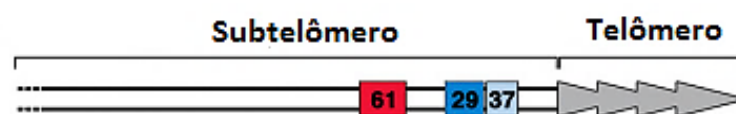


Figura 5- Esquema mostrando a disposição e localização da sequência promotora (“61-29-37 repeats”) dentro

região subtelomérica (adaptado de NERGADZE et al., 2009).

Acredita-se que esta sequência seja a região promotora que controla a transcrição de TERRA nestes cromossomos, visto que esta região possui um teor global elevado (67% - 86%) de dinucleotídeos CpG (típicos de ilhas CpG), encontradas em muitos promotores de vários genes de eucariotos (NERGADZE et al., 2009).

O grau de metilação da citosina nessas repetições conservadas se correlaciona negativamente com a abundância de TERRA, ou seja, um perfil de alta metilação de citosina nas ilhas CpG da região promotora reprime a atividade transcricional de TERRA (AZZALIN & LINGNER, 2008; LUKE & LINGNER, 2009; NERGADZE et al., 2009). Estes resultados sugerem que TERRA é regulada epigeneticamente e que uma estrutura aberta da cromatina favorece sua transcrição (SCHOEFTNER & BLASCO, 2009).

Estas descobertas definem os telômeros humanos como componentes de "unidades gênicas integrais", apoiando a ideia de que TERRA pode exercer funções importantes na biologia dos telômeros (NERGADZE et al., 2009).

1.3. TERRA e seu papel na regulação do comprimento telomérico

Como dito anteriormente, TERRA parece desempenhar importantes funções e participar ativamente dos mecanismos que regulam a homeostase e função dos telômeros (LUKE et al., 2008; SCHOEFTNER & BLASCO, 2010; CUSANELLI & CHARTRAND, 2015). Uma dessas funções está relacionada à regulação da atividade da telomerase (CUSANELLI & CHARTRAND, 2015). As extremidades 3' de TERRA (UUAGGG) são complementares ao molde de RNA (*TERC*) da telomerase, e estudos *in vitro* em células de mamíferos mostraram a interação entre estes componentes, sugerindo que TERRA pode inibir a atividade da telomerase e promover o encurtamento telomérico (REDON et al., 2010;

SCHOEFTNER & BLASCO, 2010). De fato, células que possuem a telomerase ativa exibem graus de metilação maiores na região promotora de TERRA e níveis menores de TERRA quando comparadas com células telomerase-negativa (NG et al., 2009).

Além disso, evidências indicam que TERRA é capaz de formar híbridos DNA-RNA com os telômeros, o que poderia favorecer a recombinação homóloga entre os mesmos, atrasando a senescência celular e sustentando a instabilidade genômica (CUSANELLI & CHARTRAND, 2015).

Em oposição aos achados supracitados, estudos sugerem que TERRA também possa promover o alongamento telomérico. Um estudo recente sugeriu que o encurtamento dos telômeros desencadeia a expressão de TERRA, que se acumula em um foco na periferia nuclear. Este foco favorece o recrutamento da telomerase, formando aglomerados de TERRA-telomerase, que posteriormente se associam aos telômeros curtos que originaram as moléculas de TERRA (ou seja, atuam *in cis*) (CUSANELLI et al., 2013). Desta forma, sugere-se que o encurtamento do telômero induz a expressão de TERRA, os quais funcionam como identificadores únicos da extremidade cromossômica em que foram transcritos e contribuem para o recrutamento e a atividade da telomerase em telômeros mais curtos, promovendo seu alongamento (SMEKALOVA & BAUMANN, 2013).

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

2. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo investigar os perfis de expressão de TERRA em leucemias mielóides agudas (LMAs), os agentes moduladores e mecanismos que podem estar envolvidos neste processo.

Como pontos específicos desta pesquisa, destacam-se:

- Medir o comprimento dos telômeros de indivíduos saudáveis e de pacientes com LMA;
- Avaliar os níveis de expressão de TERRA nestes indivíduos;
- Avaliar os níveis de expressão de *TERT* e *TRF2*;
- Verificar se os perfis de TERRA podem ser utilizados como futuros “alvos terapêuticos” nessas doenças, e sua relação com a etiologia das mesmas.

3. Material e métodos

3.1. Amostras

Participaram do estudo pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e indivíduos saudáveis, seguindo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da USP- Ribeirão Preto (CAAE: 56533316.1.0000.5440), com conformidade do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Amostras de sangue periférico e/ou medula óssea foram coletadas, para posterior extração de DNA, RNA e proteínas.

Duas linhagens celulares (VA-13 e HeLa) foram utilizadas como controle para todos os ensaios subsequentes realizados.

3.2. PCR quantitativo (qPCR) para a medição do comprimento telomérico

A qPCR foi realizada conforme descrito por (CAWTHON, 2002; 2009) com modificações. Resumidamente, o DNA genômico foi extraído do “buffy coat” de amostras de sangue ou medula pelo kit Gentra Puregene Blood (Qiagen). O DNA foi quantificado por análise no Denovix e sua integridade verificada em gel de agarose (1%). As reações de PCR foram realizadas em triplicatas, consistindo-se do fluorocromo SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), oligonucleotídeos iniciadores [10 µM] e 1,6 ng de DNA por reação. As curvas padrão foram geradas utilizando 6 diluições em série (1:2) de gDNA (10 ng). Realizou-se a amplificação e quantificação no Rotor-Gene Q (Qiagen) em duas etapas: primeiro, utilizando iniciadores para repetições teloméricas (T) e segundo, utilizando iniciadores para o gene de cópia única *36B4* (S).

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

O comprimento médio dos telômeros para cada amostra é calculado como a razão relativa de T/S. O resultado final para uma dada amostra representa a média e o erro padrão da média para pelo menos dois ensaios independentes.

3.3. Extração de RNA e amplificação de TERRA por qRT-PCR

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol LS (Ambion), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, quantificou-se o RNA por análise no Denovix e sua integridade verificada em gel de agarose (0,8%). O mesmo foi tratado com RNase-Free DNase Set (Qiagen) e purificado com o kit RNA clean & concentrator (Zymo Research) 3 vezes, para evitar o menor resquício de contaminação com DNA na amostra, pois o mesmo interfere de maneira significativa na reação. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher), utilizando oligonucleotídeos específicos para a região telomérica (CCCTAA)₅ [10 µM], assim como um controle (β-actina, 1 µM).

As reações de amplificação e quantificação foram realizadas no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram estudadas 4 regiões cromossômicas subteloméricas (20q, 10q, 15q e Xq/Yq) utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos [10 µM] para cada região, nas quais 2 delas (10q e 15q) possuem região promotora de TERRA rica em ilhas CpG. As curvas padrão foram geradas utilizando 9 diluições em série (1:2) de gDNA (10 ng).

As condições da qPCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. A expressão relativa de TERRA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2002) normalizada com uma amostra de referência

(β -actina). Todas as reações foram realizadas em triplicata, com pelo menos dois ensaios biológicos independentes.

3.4. Extração de RNA e expressão de *TERT* e *TRF2* por qRT-PCR

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

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

As condições da qPCR no termociclador foram seguidas: um passo inicial a 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. Todas as reações foram realizadas em triplicata, com pelo menos dois ensaios biológicos independentes. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2002) normalizada com uma amostra de referência (β -actina).

3.5. Análise estatística

O Software Prism 5.1 (GraphPad) foi utilizado na análise estatística e criação dos gráficos. Realizou-se a análise de co-variância (ANOVA) para comparar as taxas de alongamento. Os níveis de expressão relativa de *TERRA*, *TERT* e *TRF2* foram determinados pelo método de Pfaffl (2002) (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), com análise estatística realizada através do “Pair

Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]” no Software REST[®] 2009, sendo estabelecido $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1. Dados dos pacientes

Na figura abaixo (Figura 6), estão elencados dados relativos às amostras coletadas de indivíduos saudáveis e pacientes com LMA.

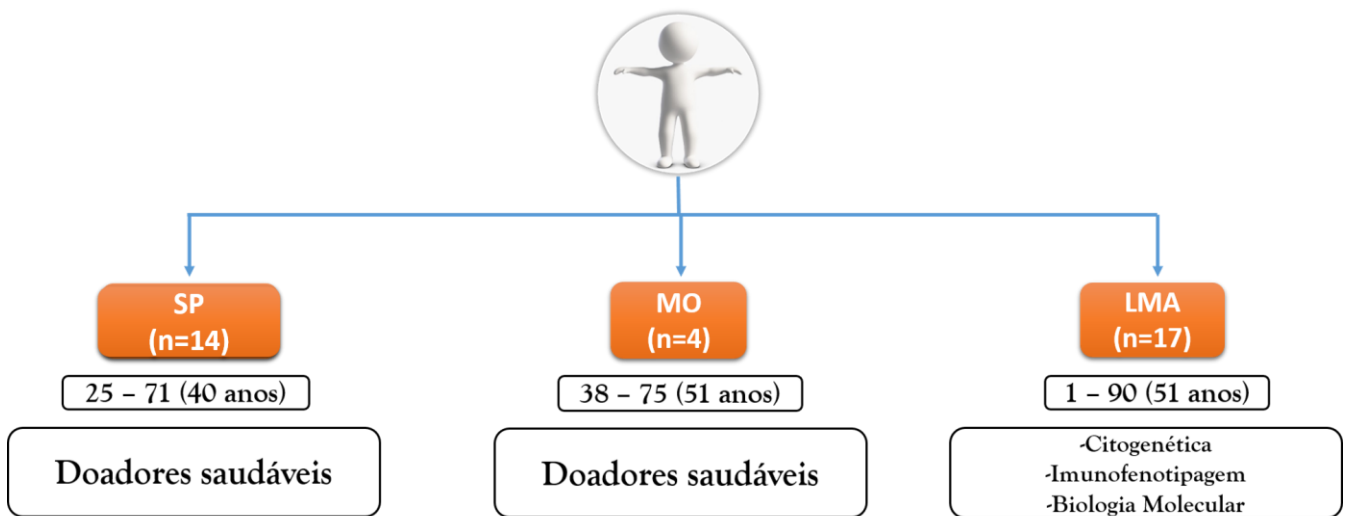


Figura 6- O esquema mostra os grupos de indivíduos (separados por etiologia), número amostral, média de idade e os métodos utilizados para classificação. SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda.

4.2. Mensuração do comprimento telomérico

A Figura 7 mostra o comprimento médio dos telômeros, calculado através da razão relativa de T/S. As linhagens celulares VA-13 e Hela tiveram um maior comprimento telomérico em relação aos grupos saudáveis (SP e MO). Provavelmente este aumento seja devido à ação da telomerase (que é ativa em Hela) e do mecanismo de ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*, alongamento do telômero por recombinação homóloga) presente na VA-13, que mantêm os telômeros em um comprimento constante e/ou elevado, apesar da alta ciclagem destas células.

Em contrapartida, as amostras de LMA mostraram um comprimento telomérico diminuído em relação aos grupos saudáveis. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores (CALADO, 2009; WANG et al., 2014; EL BELBESY et al., 2015) e podem estar relacionados ao acúmulo de danos no DNA, levando ao desenvolvimento da instabilidade genômica presente nestas neoplasias, contribuindo para a patogênese e o encurtamento dos telômeros (XU; LI; STOHR, 2013).

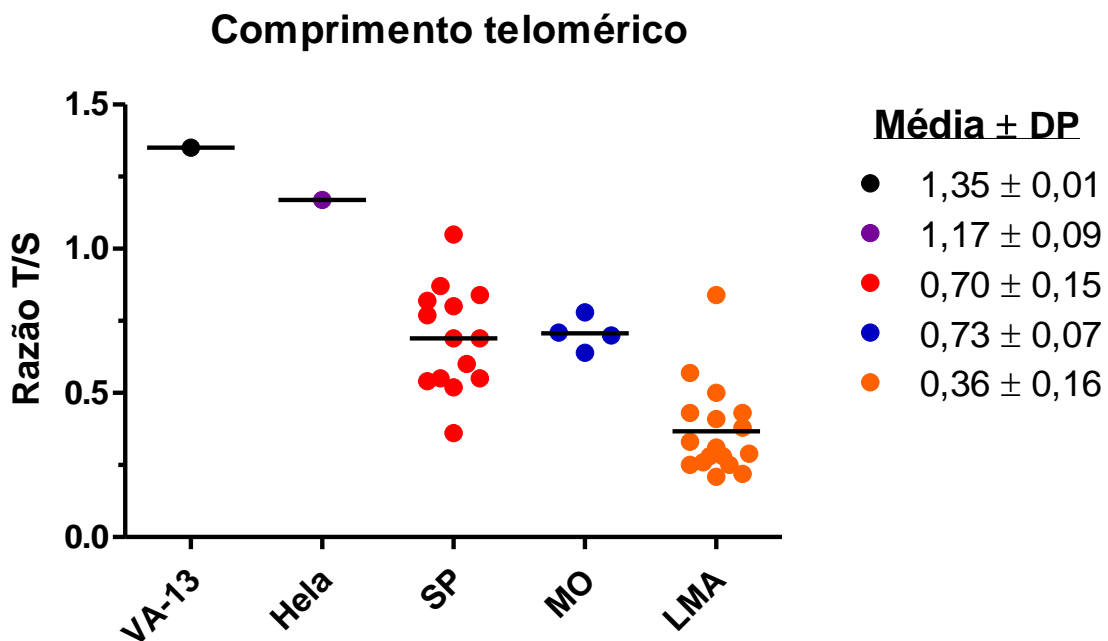


Figura 7- O gráfico scatterplot mostra o comprimento médio dos telômeros calculado através da razão relativa de T/S. DP: desvio padrão; SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda.

4.3. Expressão de TERRA por RT-qPCR

Realizou-se a RT-qPCR para verificar a expressão relativa de TERRA das regiões subteloiméricas dos cromossomos 20q, 15q, 10q e Xq/Yq. Células VA-13 foram utilizadas como amostra controle, pois é uma linhagem com mecanismo de ALT ativo e possui

níveis de expressão de TERRA maiores do que as telomerase-positivas (EPISKOPOU et al., 2014; YU; KAO; LIN, 2014).

Na Figura 8, têm-se os resultados da expressão de TERRA de todas as regiões subteloméricas estudadas. Células Hela mostraram uma expressão relativa bastante diminuída em relação à VA-13 em todas as regiões subteloméricas. Pelo fato de Hela ser uma linhagem telomerase-positiva, esperava-se que sua expressão de TERRA fosse diminuída (BRYAN et al., 1995).

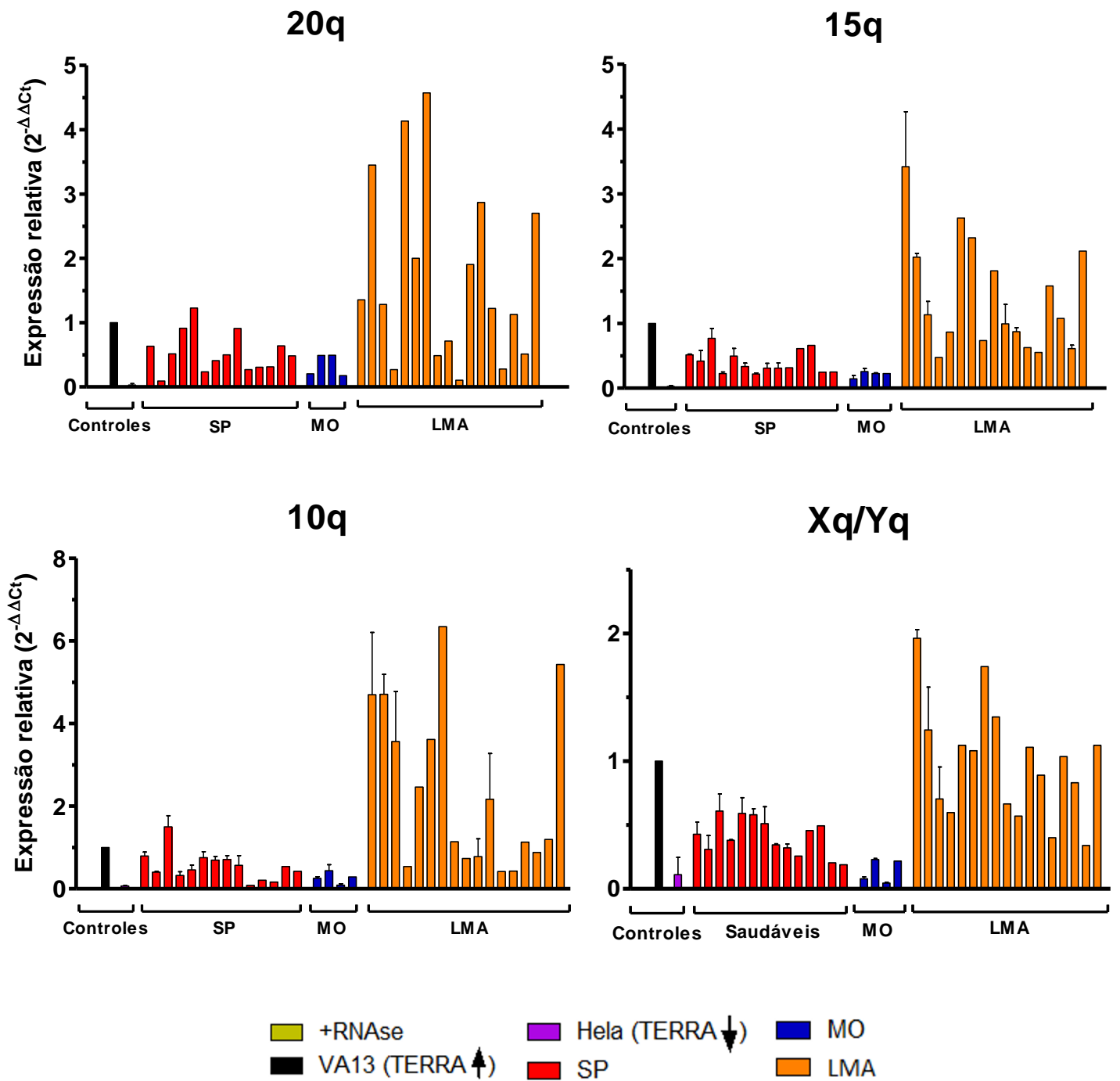


Figura 8- Expressão relativa de TERRA das regiões subtelo méricas dos cromossomos 20q, 15q, 10q e Xq/Yq. SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda.

As amostras de indivíduos saudáveis (sangue periférico e medula óssea) também apresentaram uma expressão diminuída de TERRA, embora não tão acentuada quanto Hela. Ao mesmo tempo, nota-se que, de maneira geral, as amostras de medula óssea (MO)

tiveram uma expressão menor do que as de sangue periférico (SP). Este resultado pode estar refletindo indiretamente o comprimento telomérico e a atividade da telomerase, que são maiores na MO do que no SP e, portanto, com expressão de TERRA menor (BROCCOLI; YOUNG; DE LANGE, 1995; OHYASHIKI et al., 2002).

Surpreendentemente (e apesar de uma certa heterogeneidade), as amostras de leucemia mieloide aguda (LMA) mostraram uma expressão muito aumentada de TERRA para todas as regiões subteloméricas estudadas em relação à VA-13. A diferença na expressão de TERRA nessa neoplasia poderia em parte ser explicada pelo comprimento telomérico. Foi demonstrado que, em leveduras que possuem telômeros criticamente curtos, a expressão de TERRA seria induzida, e estas moléculas transcritas formariam agregados com a telomerase (“clusters” TERRA-telomerase), sendo posteriormente recrutados até os telômeros mais curtos (do qual TERRA foi originado), auxiliando a promover seu alongamento (CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; SMEKALOVA; BAUMANN, 2013).

Isso poderia explicar os resultados encontrados nas amostras de LMA. A indução de TERRA (em decorrência dos telômeros encurtados) auxiliaria as moléculas de telomerase posteriormente a atuar nos telômeros mais curtos, impedindo assim a senescência e morte destas células, apesar de sua rápida ciclagem celular. Embora seja paradoxal, frequentemente encontra-se telômeros curtos e telomerase ativa em amostras de LMA (DEVILLE; HILLION; SÉGAL-BENDIRDJIAN, 2009; WANG et al., 2014).

4.4. Expressão de TERT por RT-qPCR

O gene da transcriptase reversa (*TERT*), componente catalítico da telomerase, é o cerne da atividade da mesma. Embora a função desse gene possa ser modulada em diferentes níveis (tanto pós-transcricional como pós-translacional), a atividade da telomerase é regulada

principalmente através do controle transcricional da expressão de *TERT* em muitos tipos celulares e mostra-se aumentada em quase 90% dos cânceres, desempenhando assim um papel crítico na proliferação e potencial de sobrevivência de várias células cancerosas (POOLE; ANDREWS; TOLLEFSBOL, 2001; WU et al., 2013).

Desta forma, realizou-se a RT-qPCR com o intuito de verificar a relação entre os resultados encontrados no comprimento telomérico e os níveis de expressão relativa de *TERRA* e *TERT* (Figura 09). Conforme esperado, observa-se uma alta expressão de *TERT* em HeLa (que é telomerase-positiva), ao passo que VA-13, por ser uma linhagem telomerase-negativa (e manter seu comprimento telomérico pelo mecanismo de ALT) não apresentou nenhuma expressão.

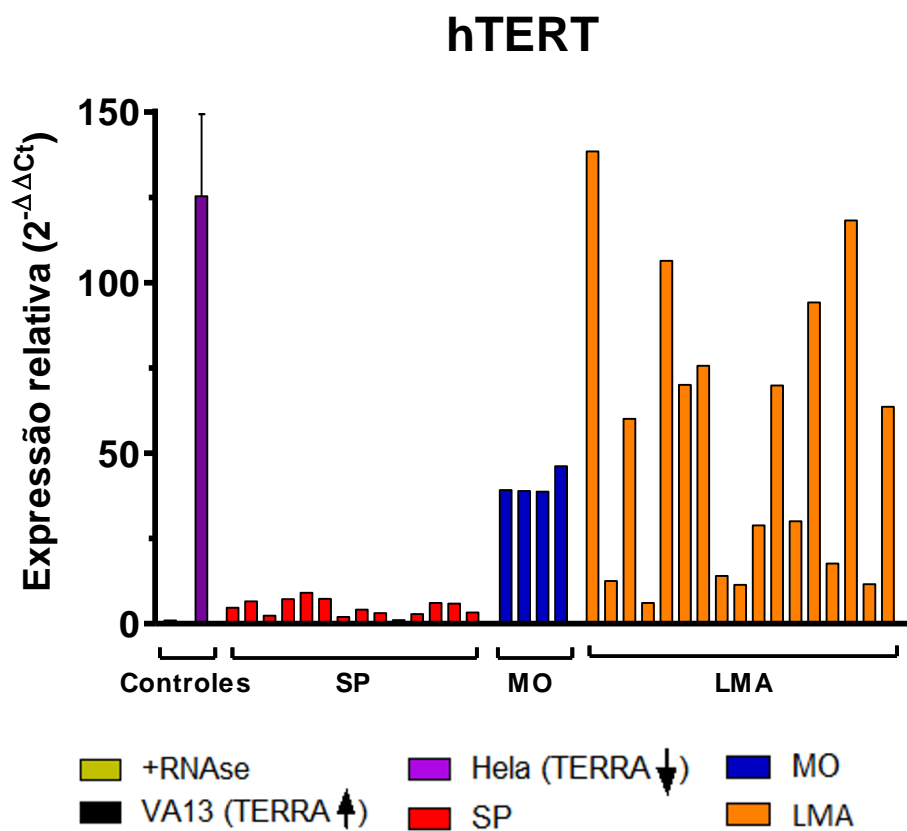


Figura 09- Expressão relativa de *TERT* (componente catalítico da telomerase). SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mieloide aguda.

Da mesma maneira, as amostras saudáveis (sangue periférico e medula óssea) apresentaram expressão de *TERT*, com níveis significativamente maiores de expressão na medula do que no sangue periférico. É esperado que em células da medula óssea, por serem formadas em sua maioria por células progenitoras, tenham uma expressão ativa de *TERT*. De maneira semelhante, embora a maioria das células somáticas careça inteiramente de atividade da telomerase ou tenha níveis muito baixos (MASUTOMI et al., 2003), algumas células (como o sangue periférico) possuem alguma atividade basal de telomerase (BROCCOLI; YOUNG; DE LANGE, 1995), o que justificaria os baixos níveis encontrados nas amostras estudadas (XU; LI; STOHR, 2013).

As amostras de LMA, de maneira semelhante à Hela, apresentaram em sua maioria alta expressão de *TERT*. Esses achados sugerem um importante papel da perda intensa dos telômeros no desenvolvimento da instabilidade genética durante a patogênese da LMA. Supõe-se que o encurtamento crítico dos telômeros em blastos de LMA pode levar à ativação da telomerase (possivelmente através da expressão de *TERRA*) e, portanto, prevenir o surgimento da senescência replicativa nos blastos, um possível mecanismo para a seleção clonal e progressão da doença (HARTMANN et al., 2005; WANG et al., 2014).

4.5. Expressão de *TRF2* por RT-qPCR

Uma função crítica da proteína associada aos telômeros *TRF2* (componente do complexo shelterina/telossomo) é a manutenção da integridade telomérica, protegendo as extremidades dos cromossomos de serem reconhecidas como quebras de dupla-fita de DNA, que conduziria à ativação do processo de resposta e reparo de danos no DNA (PALM; DE LANGE, 2008).

Estudos anteriores sugerem uma possível relação inversa entre TRF2 e TERRA, com alta expressão de TERRA quando os níveis expressos do gene *TRF2* apresentavam-se diminuídos e vice-versa (PORRO et al., 2014). Desta forma, foi realizada a mensuração da expressão relativa de *TRF2* por RT-qPCR para verificar se esse perfil também seria encontrado em nossas amostras.

Na Figura 10, é possível notar que as amostras saudáveis (sangue periférico e medula óssea) tiveram uma expressão diminuída de *TRF2* em relação à VA-13. Isso pode ser em decorrência do maior comprimento telomérico presente em VA-13 (e consequentemente, mais moléculas de TRF2 necessárias para formar o telossomo e proteger o telômero aumentado). Uma outra possibilidade seria de que as células saudáveis mostraram uma expressão diminuída por não terem acúmulo de danos no DNA como a linhagem VA-13 pode apresentar (por ser uma linhagem imortalizada e possuir alterações cromossômicas). Já foi sugerido em estudos prévios que a expressão de *TRF2* pode se tornar aumentada transitoriamente e sofrer fosforilações em resposta à danos no DNA, ativando vias de sinalização de reparo (como a via ATM, por exemplo) (HUDA et al., 2012).

De maneira diferente, as amostras de leucemia mielóide aguda (LMA) tiveram em sua maioria uma expressão de *TRF2* aumentada ou similar à VA-13. Desta forma, os resultados encontrados nas LMAs sugerem uma relação direta entre *TRF2* e TERRA, com altos níveis de expressão de ambos nesses indivíduos, indo em contrapartida ao exposto por Porro et al., (2014). Uma possível explicação seria que o telossomo reage após o dano no DNA, aumentando a atividade da telomerase e a expressão de *TRF2* em células malignas. Foi previamente demonstrado que a superexpressão de *TRF2* pode reprimir sinais de senescência resultantes de telômeros criticamente encurtados (como os presentes nas LMAs) (KLAPPER et al., 2003). Ademais, outros estudos já demonstraram o aumento da expressão de *TRF2* em células leucêmicas (CAPRARO et al., 2011), corroborando com nossos resultados encontrados.

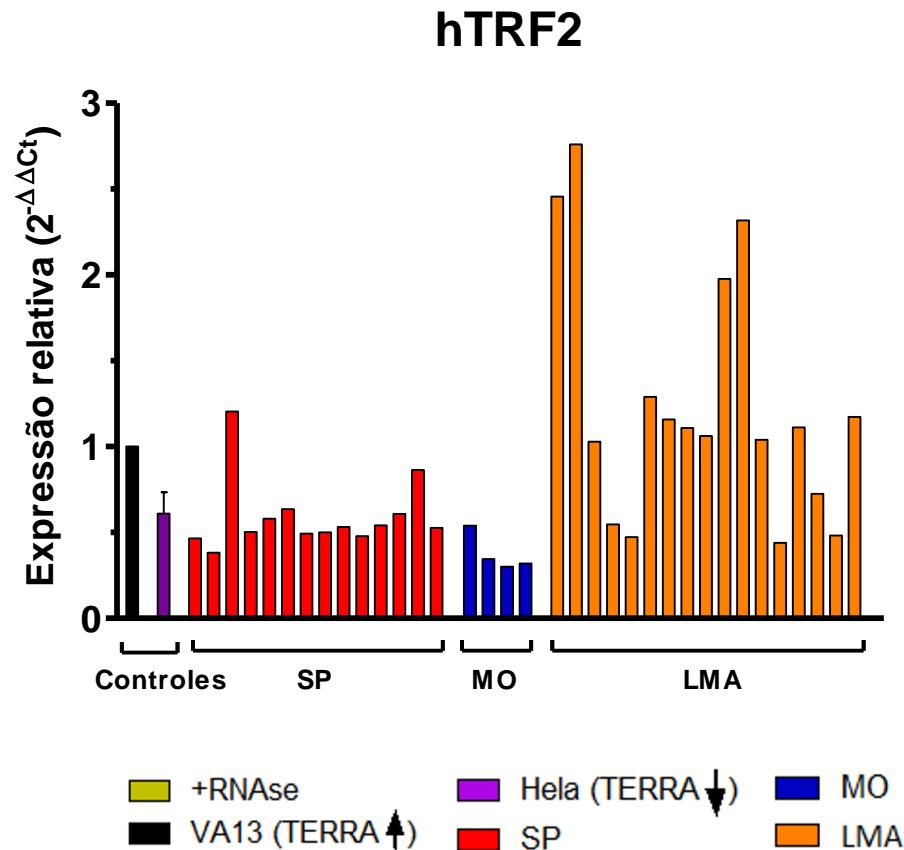


Figura 10- Expressão relativa de TRF2 (componente do complexo telossomo). SP: sangue periférico; MO: medula óssea; LMA: leucemia mielóide aguda.

Finalizando, com o intuito de demonstrar a relação entre comprimento telomérico, *TERT* e a expressão de TERRA, foi construído um Heatmap (Figura 11). Nele, nota-se a “clusterização” das amostras de LMA, sangue periférico (SP) e medula óssea (MO), o que denota um perfil de expressão semelhante de cada um destes grupos de amostras. Ademais, é possível perceber a relação inversa entre comprimento telomérico e a expressão de TERRA para todas as regiões subteloiméricas avaliadas, e a semelhança de expressão de *TERT* com TERRA, sugerindo que o encurtamento telomérico crítico presente nas LMAs estimula a transcrição de TERRA, auxiliando na regulação positiva da atividade da telomerase (“guiando-as” até os telômeros mais curtos), o que impede a senescência e apoptose destas células e

mantém a progressão da doença (BEGEMANN; GALIMI; KARLSEDER, 2009; CUSANELLI; ROMERO; CHARTRAND, 2013; SMEKALOVA; BAUMANN, 2013; WANG et al., 2014).

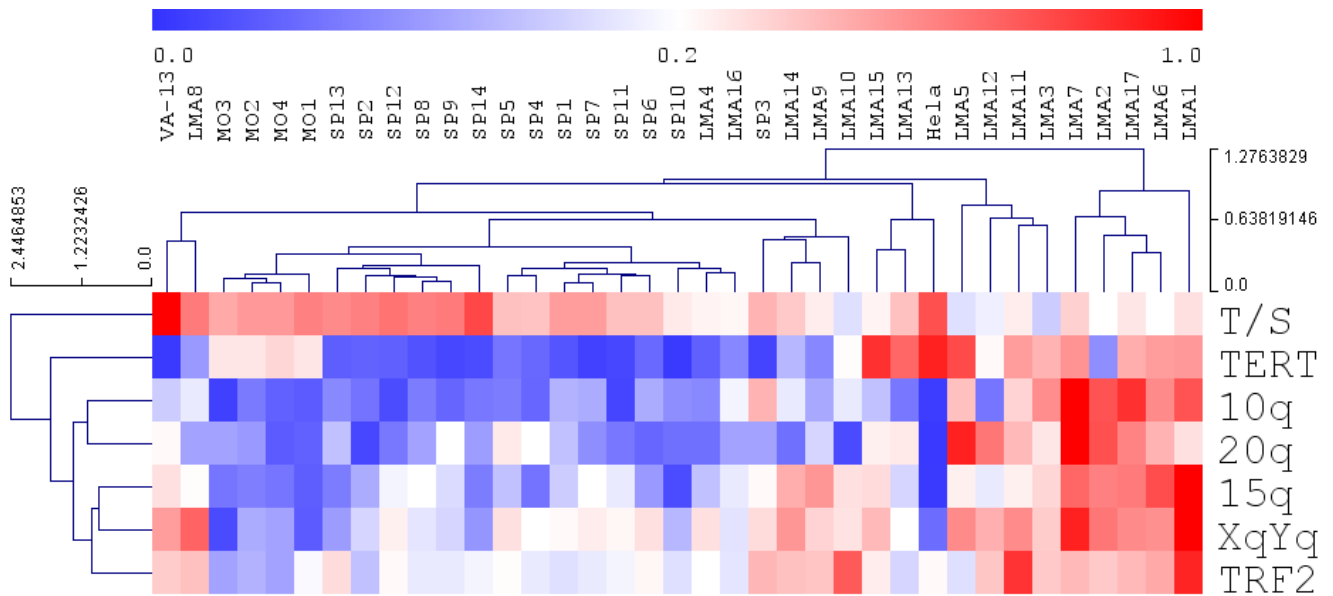


Figura 11- Heatmap mostrando a “clusterização” das amostras de LMA, sangue periférico (SP) e medula óssea (MO), o que denota um perfil de expressão semelhante destas amostras. Além disso, é possível perceber a relação inversa entre comprimento telomérico e a expressão de TERRA (20q, 15q, 10q e Xq/Yq) encontrada. Distância métrica utilizada: Distância Euclidiana; Método de clusterização: “Average linkage clustering”.

6. Conclusão

Nossos dados sugerem que, em decorrência dos danos ao DNA e do encurtamento telomérico crítico presente nas LMAs, a transcrição de TERRA poderia ser estimulada, auxiliando na regulação positiva da atividade da telomerase (“guiando-as” até os telômeros mais curtos). Concomitantemente, ocorreria um aumento transitório da expressão de TRF2 e consequente ativação de vias de reparo em decorrência do acúmulo de danos, impedindo a senescência e atuando como mecanismos anti-apoptóticos na resposta ao dano no DNA de células leucêmicas agudas.

Desta forma, TERRA parece atuar como um importante modulador na etiologia das leucemias mielóides agudas, e poderia ser utilizado como um futuro “alvo terapêutico” nessa doença.

7. Bibliografia

- ARMANIOS, M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. **Mutation research**, v. 730, n. 1–2, p. 52–8, 1 fev. 2012.
- ARMANIOS, M. Y.; CHEN, J. J.-L.; COGAN, J. D.; ALDER, J. K.; INGERSOLL, R. G.; MARKIN, C.; LAWSON, W. E.; XIE, M.; VULTO, I.; PHILLIPS, J. A.; LANSDORP, P. M.; GREIDER, C. W.; LOYD, J. E. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 13, p. 1317–26, 29 mar. 2007.
- AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomeres: the silence is broken. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 9, p. 1161–5, 1 maio 2008.
- AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–36, 2015.
- AZZALIN, C. M.; REICHENBACH, P.; KHORIAULI, L.; GIULOTTO, E.; LINGNER, J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2007.
- BEGEMANN, S.; GALIMI, F.; KARLSEDER, J. Moderate expression of TRF2 in the hematopoietic system increases development of large cell blastic T-cell lymphomas. **Aging**, v. 1, n. 1, p. 122–130, 2009.
- BENETTI, R.; SCHOEFTNER, S.; MUÑOZ, P.; BLASCO, M. A. Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 7, n. 21, p. 3461–8, 1 nov. 2008.
- BROCCOLI, D.; YOUNG, J. W.; DE LANGE, T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9082–6, 1995.
- BRYAN, T. M.; ENGLEZOU, A.; GUPTA, J.; BACCHETTI, S.; REDDEL, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. **The EMBO journal**, v. 14, n. 17, p. 4240–8, 1995.
- CALADO, R. T. Telomeres and marrow failure. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 338–43, jan. 2009.
- CALADO, R. T.; DUMITRIU, B. Telomere Dynamics in Mice and Humans. **Seminars in Hematology**, v. 50, n. 2, p. 165–174, abr. 2013.
- CALADO, R. T.; REGAL, J. A.; KLEINER, D. E.; SCHRUMP, D. S.; PETERSON, N. R.; PONS, V.; CHANOCK, S. J.; LANSDORP, P. M.; YOUNG, N. S. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7926, jan. 2009.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4446–55, 1 maio 2008.
- CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353–65, 10 dez. 2009.
- CAPRARO, V.; ZANE, L.; PONCET, D.; PEROL, D.; GALIA, P.; PREUDHOMME, C.; BONNEFOY-BERARD, N.; GILSON, E.; THOMAS, X.; EL-HAMRI, M.; CHELGHOUN, Y.; MICHALLET, M.; WATTEL, E.; MORTREUX, F.; SIBON, D. Telomere deregulations

possess cytogenetic, phenotype, and prognostic specificities in acute leukemias. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 2, p. 195–202, 2011.

CASLINI, C.; CONNELLY, J. A.; SERNA, A.; BROCCOLI, D.; HESS, J. L. MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 16, p. 4519–26, ago. 2009.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 10, p. e47, 2002.

CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. e21–e21, 7 jan. 2009.

COUNTER, C.; GUPTA, J.; HARLEY, C.; LEBER, B.; BACCHETTI, S. Telomerase Activity in Normal Leukocytes and in Hematologic Malignancies. **Blood**, v. 85, n. 9, p. 2315–2320, 1 maio 1995.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric noncoding RNA: telomeric repeat-containing RNA in telomere biology. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 5, n. 3, p. 407–19, 2014.

CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. April, p. 1–9, 2015.

CUSANELLI, E.; ROMERO, C.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 780–791, 2013.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & development**, v. 19, n. 18, p. 2100–10, 15 set. 2005.

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

DENG, Z.; NORSEEN, J.; WIEDMER, A.; RIETHMAN, H.; LIEBERMAN, P. M. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. **Molecular cell**, v. 35, n. 4, p. 403–13, 28 ago. 2009.

DENG, Z.; WANG, Z.; XIANG, C.; MOLCZAN, A.; BAUBET, V.; CONEJO-GARCIA, J.; XU, X.; LIEBERMAN, P. M.; DAHMANE, N. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 18, p. 4383–94, 15 set. 2012.

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

DIAZ DE LEON, A.; CRONKHITE, J. T.; KATZENSTEIN, A.-L. A.; GODWIN, J. D.; RAGHU, G.; GLAZER, C. S.; ROSENBLATT, R. L.; GIROD, C. E.; GARRITY, E. R.; XING, C.; GARCIA, C. K. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. **PLoS one**, v. 5, n. 5, p. e10680, jan. 2010.

DU, H.-Y.; MASON, P. J.; BESSLER, M.; WILSON, D. B. TINF2 mutations in children with severe aplastic anemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 52, n. 5, p. 687, maio 2009.

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

- EPISKOPOU, H.; DRASKOVIC, I.; VAN BENEDEN, A.; TILMAN, G.; MATTIUSI, M.; GOBIN, M.; ARNOULT, N.; LONDOÑO-VALLEJO, A.; DECOTTIGNIES, A. Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 7, p. 4391–4405, 2014.
- FEUERHAHN, S.; IGLESIAS, N.; PANZA, A.; PORRO, A.; LINGNER, J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3812–3818, 2010.
- FRANK, A. K.; TRAN, D. C.; QU, R. W.; STOHR, B. A.; SEGAL, D. J.; XU, L. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. **PLoS genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005410, jul. 2015.
- GÜRKAN, E.; TANRIVERDI, K.; BAŞLAMİŞLI, F. Telomerase activity in myelodysplastic syndromes. **Leukemia research**, v. 29, n. 10, p. 1131–9, out. 2005.
- HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, p. 458–60, 31 maio 1990.
- HARTMANN, U.; BRÜMMENDORF, T. H.; BALABANOV, S.; CHRISTIAN, T.; ILLME, T.; SCHNAICH, M. Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities. **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 307–316, 2005.
- HOUGHTALING, B. R.; CANUDAS, S.; SMITH, S. A role for sister telomere cohesion in telomere elongation by telomerase. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 1, p. 19–25, 1 jan. 2012.
- HUDA, N.; ABE, S.; GU, L.; MENDONCA, M. S.; MOHANTY, S.; GILLEY, D. Recruitment of TRF2 to laser-induced DNA damage sites. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 5, p. 1192–1197, 2012.
- JONES, B.; SU, H.; BHAT, A.; LEI, H.; BAJKO, J.; HEVI, S.; BALTUS, G. A.; KADAM, S.; ZHAI, H.; VALDEZ, R.; GONZALO, S.; ZHANG, Y.; LI, E.; CHEN, T. The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. **PLoS genetics**, v. 4, n. 9, p. e1000190, 9 jan. 2008.
- KLAPPER, W.; QIAN, W.; SCHULTE, C.; PARWARESCH, R. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 17, n. 10, p. 2007–2015, 2003.
- LUKE, B.; LINGNER, J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. **The EMBO journal**, v. 28, n. 17, p. 2503–10, 2 set. 2009.
- LUKE, B.; PANZA, A.; REDON, S.; IGLESIAS, N.; LI, Z.; LINGNER, J. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular cell**, v. 32, n. 4, p. 465–77, 21 nov. 2008.
- MASUTOMI, K.; YU, E. Y.; KHURTS, S.; BEN-PORATH, I.; CURRIER, J. L.; METZ, G. B.; BROOKS, M. W.; KANEKO, S.; MURAKAMI, S.; DECAPRIO, J. A.; WEINBERG, R. A.; STEWART, S. A.; HAHN, W. C. Telomerase Maintains Telomere Structure in Normal Human Cells. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 241–253, 2003.
- NERGADZE, S. G.; FARNUNG, B. O.; WISCHNEWSKI, H.; KHORIAULI, L.; VITELLI, V.; CHAWLA, R.; GIULOTTO, E.; AZZALIN, C. M. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 2009.
- NG, L. J.; CROPLEY, J. E.; PICKETT, H. A.; REDDEL, R. R.; SUTER, C. M. Telomerase

- activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 4, p. 1152–9, mar. 2009.
- O’SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 171–81, mar. 2010.
- OHYASHIKI, J. H.; SASHIDA, G.; TAUCHI, T.; OHYASHIKI, K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. **Oncogene**, v. 21, n. FEBRUARY, p. 680–687, 2002.
- PAIVA, R. M. a; CALADO, R. T. **Telomere dysfunction and hematologic disorders**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 125
- PALM, W.; DE LANGE, T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 301–334, 2008.
- PFÄFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e–36, 1 maio 2002.
- POOLE, J. C.; ANDREWS, L. G.; TOLLEFSBOL, T. O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). **Gene**, v. 269, n. 1, p. 1–12, 2001.
- PORRO, A.; FEUERHAHN, S.; DELAFONTAINE, J.; RIETHMAN, H.; ROUGEMONT, J.; LINGNER, J. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. **Nature Communications**, v. 5, p. 5379, 2014.
- PORRO, A.; FEUERHAHN, S.; REICHENBACH, P.; LINGNER, J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 20, p. 4808–4817, 2010.
- REDON, S.; REICHENBACH, P.; LINGNER, J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 17, p. 5797–806, set. 2010.
- REDON, S.; ZEMP, I.; LINGNER, J. A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 19, p. 9117–9128, 2013.
- SAMPL, S.; PRAMHAS, S.; STERN, C.; PREUSSER, M.; MAROSI, C.; HOLZMANN, K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. **Translational oncology**, v. 5, n. 1, p. 56–65, 2012.
- SASA, G. S.; RIBES-ZAMORA, A.; NELSON, N. D.; BERTUCH, A. A. Three novel truncating TINF2 mutations causing severe dyskeratosis congenita in early childhood. **Clinical genetics**, v. 81, n. 5, p. 470–8, maio 2012.
- SAVAGE, S. A.; GIRI, N.; BAERLOCHER, G. M.; ORR, N.; LANSDORP, P. M.; ALTER, B. P. TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. **American journal of human genetics**, v. 82, n. 2, p. 501–9, fev. 2008.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. A “higher order” of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. **The EMBO journal**, v. 28, n. 16, p. 2323–36, 19 ago. 2009.
- SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 2, p. 186–93, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19815087>>. Acesso em: 31 ago. 2015.
- SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Seminars in**

cancer biology, v. 21, n. 6, p. 349–53, dez. 2011.

SMEKALOVA, E.; BAUMANN, P. TERRA -A Calling Card for Telomerase. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 703–704, 2013.

STEWART, J. A.; CHAIKEN, M. F.; WANG, F.; PRICE, C. M. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. **Mutation research**, v. 730, n. 1–2, p. 12–9, 1 fev. 2012.

SVENSON, U.; ROOS, G. Telomere length as a biological marker in malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 4, p. 317–323, abr. 2009.

SWIGGERS, S. J. J.; KUIJPERS, M. A.; DE CORT, M. J. M.; BEVERLOO, H. B.; ZIJLMANS, J. M. J. M. Critically short telomeres in acute myeloid leukemia with loss or gain of parts of chromosomes. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 45, n. 3, p. 247–56, mar. 2006.

TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood Reviews**, v. 124, n. 18, p. 2775–2784, 2014.

VULLIAMY, T. J.; KIRWAN, M. J.; BESWICK, R.; HOSSAIN, U.; BAQAI, C.; RATCLIFFE, A.; MARSH, J.; WALNE, A.; DOKAL, I. Differences in Disease Severity but Similar Telomere Lengths in Genetic Subgroups of Patients with Telomerase and Shelterin Mutations. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24383, 13 set. 2011.

VULLIAMY, T.; MARRONE, A.; SZYDLO, R.; WALNE, A.; MASON, P. J.; DOKAL, I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. **Nature genetics**, v. 36, n. 5, p. 447–9, maio 2004.

WALNE, A. J.; BHAGAT, T.; KIRWAN, M.; GITIAUX, C.; DESGUERRE, I.; LEONARD, N.; NOGALES, E.; VULLIAMY, T.; DOKAL, I. S. Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 334–8, mar. 2013.

WALNE, A. J.; VULLIAMY, T.; BESWICK, R.; KIRWAN, M.; DOKAL, I. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3594–600, 1 nov. 2008.

WANG, C.; ZHAO, L.; LU, S. Role of TERRA in the Regulation of Telomere Length. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 3, p. 316–323, 2015.

WANG, L.; XIAO, H.; ZHANG, X.; WANG, C.; HUANG, H. The role of telomeres and telomerase in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

WINKLER, T.; HONG, S. G.; DECKER, J. E.; MORGAN, M. J.; WU, C.; HUGHES, W. M.; YANG, Y.; WANGSA, D.; PADILLA-NASH, H. M.; RIED, T.; YOUNG, N. S.; DUNBAR, C. E.; CALADO, R. T. Defective Telomere Elongation and Hematopoiesis from Telomerase-Mutant Aplastic Anemia iPSCs. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 5, p. 1952–63, 1 maio 2013.

WU, K.-D.; ORME, L. M.; SHAUGHNESSY, J.; JACOBSON, J.; BARLOGIE, B.; MOORE, M. A. S. Telomerase and Telomere Length in Multiple Myeloma: Correlations with Disease Heterogeneity, Cytogenetic Status, and Overall Survival. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4982–9, 15 jun. 2003.

WU, X. qin; HUANG, C.; HE, X.; TIAN, Y. yao; ZHOU, D. xi; HE, Y.; LIU, X. hua; LI, J. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: New insight into the evolving field of telomerase in cancer. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2462–2468, 2013.

XU, L.; LI, S.; STOHR, B. A. The Role of Telomere Biology in Cancer. **Annual Review of**

Pathology: Mechanisms of Disease, v. 8, n. 1, p. 49–78, 2013.

YAMAGUCHI, H.; CALADO, R. T.; LY, H.; KAJIGAYA, S.; BAERLOCHER, G. M.; CHANOCK, S. J.; LANSDORP, P. M.; YOUNG, N. S. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 14, p. 1413–24, 7 abr. 2005.

YEHEZKEL, S.; SEGEV, Y.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; SKORECKI, K.; SELIG, S. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 18, p. 2776–89, 15 set. 2008.

YEHEZKEL, S.; SHAKED, R.; SAGIE, S.; BERKOVITZ, R.; SHACHAR-BENER, H.; SEGEV, Y.; SELIG, S. Characterization and rescue of telomeric abnormalities in ICF syndrome type I fibroblasts. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 35, jan. 2013.

YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the new telomere diseases: practice and research. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 17 Suppl 1, p. S18-21, abr. 2012.

YU, T. Y.; KAO, Y. W.; LIN, J. J. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 9, p. 3377–3382, 2014.