

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**LUCAS KICH GRUN**

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA A  
DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMEROS EM  
DIFERENTES DESORDENS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO**

**Porto Alegre**

**2015**

**LUCAS KICH GRUN**

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA A  
DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMEROS EM  
DIFERENTES DESORDENS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito essencial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Florencia María Barbé-Tuana

Coorientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

**PORTO ALEGRE**

**2015**

**LUCAS KICH GRUN**

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA A  
DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMEROS EM  
DIFERENTES DESORDENS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO**

Dissertação aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ para obtenção do título de Mestre em Bioquímica  
pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Daniel Pens Gelain

---

Dr. Gabriel Rodrigo Fries

---

Dra. Vanessa Schein

**Porto Alegre**

**2015**

## AGRADECIMENTOS

Todas as pessoas que estiveram comigo durante o desenvolvimento desse projeto me auxiliaram de alguma forma, de forma que merecem meus profundos agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço os principais responsáveis pelas infinitas realizações dos meus sonhos e objetivos, meus pais Jorge e Mari. Esforço-me diariamente a fim de me tornar alguém com o caráter e a dignidade de vocês. Obrigado por lutarem e conquistarem esse título comigo.

Faltam palavras para agradecer tudo que me foi proporcionado pela professora Dra. Fátima, coorientadora deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos começam há cinco anos, quando me aceiteste como aluno de iniciação científica. Hoje posso dizer que é uma grande escolha de minha vida participar como aluno do Laboratório 21. Obrigado professora, por me aceitar como aluno, pelos incontáveis ensinamentos, e principalmente por me colocar em contato com a professora Dra. Florencia.

Em especial, agradeço a professora Dra. Florencia, minha excelentíssima orientadora há três maravilhosos anos de muita aprendizagem, ensinamentos, conselhos, conversas sobre a vida, e muito respeito. Teu entusiasmo e competência é uma grande qualidade, e eu agradeço por fazer parte do teu grupo de pesquisa. Hoje eu tenho a certeza de que és mais que uma orientadora, tornaste minha amiga. Obrigado por tudo.

Agradeço à minha família, que me apoiou da forma que puderam. Meus padrinhos, tios e minha vó, sempre querendo saber, e entender um pouco mais sobre o que eu estudava. Meus primos também merecem um agradecimento, por estarem comigo em todos os momentos, sejam eles difíceis ou comemorando. Em especial, agradeço à minha prima (na verdade, irmã) Kesiane, que sempre foi minha inspiração, e meu espelho.

Agradeço a minhas tias emprestadas, Lúcia e Leda, que estão presentes diariamente, e oferecem um suporte inimaginável. A elas, um fortíssimo agradecimento, por tudo.

Agradeço a uma pessoa muito especial em minha vida, que mesmo pensando não estar me ajudando o suficiente, foi com certeza quem mais me deu forças pra continuar, nesses dois anos. Tu também és meu exemplo de pessoa, a quem eu sempre tento me espelhar, obrigado por estar sempre ao meu lado, Valen. Foste fundamental nesse tempo todo. Também agradeço especialmente à Alejandra, Daniel e Facundo (principalmente pelas ideias estatísticas).

Agradeço muito aos meus colegas (amigos) de laboratório. A convivência com vocês torna tudo mais fácil. Hoje considero o laboratório 21 como minha segunda casa, e vocês são os grandes responsáveis por isso. Obrigado, Gabi, Leo, Fran, Pri (sempre considerada da casa), Tati, Mari Ilha, Babi, Ketlen, Cleverson, Elvira, Silvia. Compartilhamos ótimos momentos dentro e fora do laboratório. Agradeço especialmente ao grupo dos telômeros, que tem crescido nos últimos dias. Agradeço à Mari Parisi, minha colaboradora e minha amiga, por toda a ajuda e companheirismo nesses anos. Agradeço ao Nevtón, novo integrante do grupo, o qual tem um entusiasmo contagiante, e nos ajudará muito. Agradeço a Pati, nossa aluna de iniciação científica (emprestada) pelo seu esforço, curiosidade e grande ajuda nesse projeto.

Também agradeço à equipe de médicos do Instituto de Pesquisas Biomédicas e do Centro de Obesidade Mórbida da PUCRS, colaboradores desse projeto, Dr. Marcus Jones, Dr. Alexandre Padoin, Dr. Cláudio Mottin, Dra. Rita Mattiello, Dr. Paulo Márcio Pitrez, Dra. Helen Zatti e a Dra. Letícia Alves.

Agradeço a todos meus amigos fora do laboratório, que têm sido muito pacientes durante esse momento, principalmente nessa fase final. Meus amigos que conheci na graduação, meus amigos do colégio e os babilônicos merecem um agradecimento especial, meus brothers de sempre, na boa ou na ruim, obrigado por tudo, irmãos.

Agradeço aos componentes da banca, pela disponibilidade e interesse na avaliação desse trabalho. Obrigado ao relator Dr. Daniel Gelain, e aos professores que compõem o restante da banca, Dr. Gabriel Fries e Dra. Vanessa Schein.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Ana Carolina a quem eu repetidas vezes procurei querendo respostas do equipamento que estava em manutenção. Também agradeço a Cléia e aos meus parceiros Douglas e Giordano, pelas dúvidas e os problemas resolvidos na secretaria.

Agradeço profundamente à todos os voluntários que participaram desse projeto, sua disponibilidade e interesse ajudaram na execução deste trabalho, e, na verdade, todos os agradecimentos que eu faria agora, não seriam suficientes. Agradeço a todos.

Por último, agradeço ao financiamento dos órgãos de pesquisa CAPES e CNPq para a execução desse projeto.

*"A viagem nunca acaba. Só os viajantes acabam [...]  
O fim de uma viagem é apenas o começo de outra.  
É preciso ver o que não foi visto [...] É preciso voltar aos passos que foram dados,  
para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles.  
É preciso recomeçar a viagem. Sempre." (José Saramago)*

# SUMÁRIO

## PARTE I

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. TELÔMEROS .....	14
<b>1.1.1. Histórico .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2. Estrutura e função dos telômeros .....</b>	<b>15</b>
1.1.2.1. Replicação telomérica .....	17
<b>1.1.3. Marcador de idade biológica .....</b>	<b>19</b>
1.1.3.1. Telomerase .....	21
1.1.3.1.1. Associação com doenças em mamíferos .....	24
<b>1.1.4. Determinação do comprimento de telômeros .....</b>	<b>27</b>
1.1.4.1. <i>Southern Blot</i> .....	28
1.1.4.2. <i>Q-FISH, Flow-FISH e PRINS</i> .....	29
1.1.4.3. <i>Hibridization Protection Assay</i> .....	31
1.1.4.4. Quantificação da saliência 3'OH de fita simples .....	31
1.1.4.5. PCR em tempo real .....	32
1.1.4.5.1. Quantificação relativa .....	33
1.1.4.5.2. Quantificação absoluta .....	34
1.1.4.6. <i>STELA</i> .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36

## PARTE II

<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>38</b>
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	38
4.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO .....	38
<b>4.2.1. Crianças ex-prematuros .....</b>	<b>38</b>
4.2.1.1. Critérios de inclusão .....	38
4.2.1.2. Critérios de exclusão .....	39



4.2.1.3.	Coleta do material biológico .....	39
<b>4.2.2.</b>	<b>Asmáticos</b> .....	39
4.2.2.1.	Critérios de inclusão.....	39
4.2.2.2.	Critérios de exclusão .....	40
4.2.2.3.	Coleta do material .....	40
<b>4.2.3.</b>	<b>Obesidade severa</b> .....	40
4.2.3.1.	Critérios de inclusão.....	40
4.2.3.2.	Critérios de exclusão .....	41
4.2.3.3.	Coleta do material .....	41
4.3.	<b>TÉCNICAS</b> .....	42
<b>4.3.1.</b>	<b>Material biológico</b> .....	42
4.3.1.1.	Purificação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	42
<b>4.3.2.</b>	<b>Extração de DNA genômico</b> .....	42
4.3.2.1.	Kit de extração PureLink® Genomic DNA .....	43
4.3.2.2.	Kit de extração Qiagen FlexiGene DNA.....	43
4.3.2.3.	Método do Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.....	43
<b>4.3.3.</b>	<b>Avaliação do comprimento relativo de telômeros</b> .....	44
4.3.3.1.	Reação para amplificação de telômeros (T) e do gene 36B4 (S) .....	45
4.3.3.2.	Análise e documentação dos géis de agarose.....	46
4.4.	<b>ESTATÍSTICA</b> .....	47
<b>4.4.1.</b>	<b>Tamanho amostral</b> .....	47
<b>4.4.2.</b>	<b>Testes estatísticos</b> .....	48
<b>5.</b>	<b>ÉTICA</b> .....	48
<b>6.</b>	<b>TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS</b> .....	49
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	50
7.1.	RENDIMENTO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE gDNA .....	50
7.2.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR .....	51
7.3.	VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO T/S EM DIFERENTES POPULAÇÕES .....	56
<b>7.3.1.</b>	<b>Crianças nascidas prematuramente</b> .....	56
<b>7.3.2.</b>	<b>Crianças portadoras de asma</b> .....	57
<b>7.3.3.</b>	<b>Indivíduos adultos portadores de obesidade</b> .....	59
<b>PARTE III</b>		
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	71

LISTA DE TABELAS .....	85
ANEXO A (Questionário sobre qualidade de vida FACES III).....	86

## **PARTE I**

## RESUMO

Evidências demonstram uma associação entre o aumento dos níveis de estresse crônico e o desenvolvimento de diferentes patologias, promovendo um desgaste do organismo que acelera a taxa de declínio das funções fisiológicas levando a senescência celular. A possibilidade de identificar potenciais biomarcadores em estágios iniciais de exposição a condições adversas e acompanhá-los ao longo da progressão clínica, podem torná-los ferramentas extremamente úteis no esclarecimento de diversas desordens. As sequências finais dos cromossomos, denominadas telômeros, representam um novo biomarcador de senescência celular. São responsivos a mudanças ambientais e parecem ter um papel essencial no ajuste das respostas fisiológicas e socioambientais. O encurtamento dos telômeros ao longo do ciclo vital está associado a diferentes variáveis de estilo de vida, estresse oxidativo ou psicológico e doenças crônicas, sugerindo que o comprimento dos telômeros pode ser reconhecido como um bom indicador do estado geral de saúde e da idade biológica dos indivíduos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi padronizar e estabelecer uma técnica para a determinação do comprimento relativo de telômeros por qPCR (através da razão T/S), a partir de três tecidos diferentes, e validar a técnica em três desordens diferentes em relação a suas respectivas populações controle. A análise dos resultados demonstrou que foi possível padronizar a detecção do comprimento relativo de telômeros em leucócitos e em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), baseado na técnica de qPCR. Utilizamos amostras de três coortes diferentes para validar nossa padronização de qPCR. Na primeira coorte não observamos diferenças no comprimento de telômeros em leucócitos de crianças ex-prematuras e seus controles (teste Mann-Whitney,  $P = 0,5219$ ). Todavia, crianças portadoras de asma severa apresentaram telômeros de leucócitos significativamente mais curtos que as crianças portadoras de asma leve ou do grupo controle (teste Kruskal-Wallis,  $P = 0,0426$ ). Ainda, detectamos um encurtamento significativo de telômeros entre o grupo asma severa, quando comparadas ao grupo controle e ao grupo asma leve (pós-teste de Dunn,  $P < 0,05$ ). Além disso, observamos uma diminuição do comprimento de telômeros em PBMC de adultos portadores de obesidade severa e o seu grupo controle (teste Mann-Whitney,  $P = 0,0006$ ). Esse efeito foi significativo e se manteve presente após ajuste para idade (teste Mann-Whitney,  $P = 0,026$ ). Também observamos uma correlação inversa significativa entre a o comprimento de telômeros e a idade de indivíduos portadores de obesidade ( $r = -0,4108$ ,  $P = 0,0116$ ) e o IMC de ambos os grupos ( $r = -0,4174$ ,  $P = 0,0005$ ). De acordo com a análise dos resultados desse estudo, em consonância com dados obtidos na literatura, é possível inferir que telômeros podem se tornar uma importante ferramenta para auxiliar em estudos sobre as bases moleculares do desenvolvimento de diversas patologias, com a finalidade de elucidar os mecanismos que possam acelerar o processo de envelhecimento.

Palavras-chave: Comprimento de telômeros; qPCR; biomarcador; senescência celular, ex-prematurados, asma, obesidade.

## ABSTRACT

Evidences demonstrate an association between increased levels of chronic stress and development of various pathologies, promoting damage to the organism which accelerates the decline of physiological functions leading to cellular senescence. The ability to identify biomarkers in early stages of exposure to adverse conditions and accompany them along clinical progression can make them extremely useful tools to elucidate several disorders. Telomeres, the ends of linear chromosomes, represent a new biomarker of cellular senescence. They are responsive to environmental changes and appear to play an essential role in the setting of physiological and social responses. The telomere shortening over the life cycle is associated with different lifestyle variables, oxidative or psychological stress and chronic diseases, suggesting that telomere length can be recognized as a good indicator of general health and biological age of individuals. Thus, the aim of this study was to establish a technique to detect relative telomere length by qPCR (T/S ratio) from three different tissues and validate the technique in three different disorders in relation to their respective controls. The results demonstrated that it was possible to standardize the detection of the relative telomere length in leukocytes and in PBMC using a qPCR-based method. We used samples from three different cohorts to validate our qPCR. We didn't observed a difference in telomere length in leukocyte from ex-preterm children and control (Mann-Whitney test,  $P = 0.5219$ ). The severe asthma group had significantly shorter telomeres when compared to the control and mild asthma group (Kruskal-Wallis test,  $P = 0,0426$ ) and . There was a significant difference when severe asthma were compared to diferença significativa entre o grupo asma severa, quando comparada ao asma leve (teste *post-hoc* de Dunn,  $P < 0,05$ ). We also observed a significant difference in telomere length in PBMC in adults with obesity when compared to controls (Mann-Whitney test,  $P = 0.0006$ ). This effect was still present, and remained so after adjustment for age (Mann-Whitney test,  $P = 0.026$ ). We also observed a significant inverse correlation between the telomere length and adults with obesity ( $r = -0.4108$ ,  $P = 0.0116$ ), and BMI in both groups ( $r = -0.4174$ ,  $P = 0.0005$ ). According to the analysis of this study and in line with data from the literature, we can infer that telomeres might become important tools to support studies on the molecular basis of the development of various diseases, in order to elucidate mechanisms that might accelerate the aging process.

Keywords: Telomere length; qPCR; biomarker; cellular senescence, ex-preterm, asthma, obesity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG	8-oxoguanina
aTL	Comprimento absoluto de telômeros
pb	Pares de base
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Flow-FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> por citometria de fluxo
DDR	Resposta ao dano no DNA
DKC1	Proteína disquerina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Solução salina tamponada com sulfato de Dulbecco
kb	Quilobases
IMC	Índice de massa corporal
M1	Estágio 1 de mortalidade
M2	Estágio 2 de mortalidade
p21	Inibidor da atividade de cinases dependentes de ciclina
p53	Supressor tumoral p53
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNA	Peptídeo de ácido nucleico
pRb	Proteína de retinoblastoma
PRINS	<i>Primed in situ</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Q-FISH	Hibridização fluorescente quantitativa <i>in situ</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rTL	Comprimento relativo de telômeros
STELA	Análise do comprimento único de telômeros
TCAB1	Proteína da telomerase acessória ao corpo Cajal-1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TR	RNA molde da telomerase
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TRF	Fragmentos de restrição terminais
T/S	Razão entre comprimento de telômeros e cópias do gene cópia única

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. TELÔMEROS

### 1.1.1. Histórico

A possibilidade da presença de estruturas especializadas no final dos cromossomos surgiu em 1938, quando Herman Muller observou, durante sua pesquisa com moscas de frutas, que raios X eram capazes de causar quebras nos cromossomos, e que essas quebras ocasionalmente se fusionavam, porém as extremidades dos cromossomos nunca se fusionavam (Muller 1938). Simultaneamente, em um estudo independente, Barbara McClintock observou um processo semelhante em cromossomos dicêntricos de milho (MCCLINTOCK, 1939). A conclusão natural foi que as extremidades eram de alguma forma, protegidas por alguma estrutura, denominado por Muller de telômeros (do grego *telos*, fim, e *meros*, parte).

Leonard Hayflick demonstrou em 1961, que células diplóides possuíam um potencial proliferativo *in vitro* limitado, de forma que as células não eram capazes de sofrer divisões indefinidamente. O momento em que as células cessavam seu ciclo foi, pela primeira vez, denominado como estado senescente (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). Anos mais tarde, estudos sobre a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) de Jim Watson (WATSON, 1972) e de Alexey Olivnikov (OLOVNIKOV, 1971) revelaram particularidades do processo de replicação do DNA, corroborando a teoria da senescência proposta por Hayflick.

Em 1978, Elizabeth Blackburn e Joe Gall observaram, durante o sequenciamento do DNA do genoma macronuclear do protozoário ciliado *Tetrahymena*, a repetição em tandem

do hexâmero TTGGGG sintetizado no sentido 5'→3' de diversas moléculas de DNA (BLACKBURN; GALL, 1978).

A partir da descoberta dos telômeros, vários estudos surgiram com a intenção de investigar a função dessa estrutura cromossomal. Em 1982, Jack Szostak comprovou a conservação dos telômeros ao longo da evolução das espécies, demonstrando que a adição da sequência telomérica de *Tetrahymena* ao DNA de levedura previamente linearizado, impedia-lhe de voltar a sua estrutura circular após a recombinação. Dessa forma definiu-se uma das funções dos telômeros como estruturas especializadas responsáveis por evitar ou impedir a fusão cromossomo-cromossomo (SZOSTAK; BLACKBURN, 1982).

### **1.1.2. Estrutura e função dos telômeros**

Hoje em dia, sabe-se que telômeros são complexos nucleoproteicos localizados nas extremidades de cada cromossomo (Figura 1). São constituídos por uma sequência de nucleotídeos em tandem não codificante, tipicamente consistindo em repetições ricas em guanina na extremidade 3'OH do DNA, denominada como fita-G (STEWART; WEINBERG, 2006). A fita complementar (extremidade 5' do DNA) é rica em citosina, e denominada como fita-C. A fita-G é sintetizada no sentido 5'→3', sendo mais longa (cerca de 150-200 nucleotídeos) que a fita complementar – em razão da saliência no final 3'OH de fita simples (KAZDA et al., 2012) (Figura 2A).



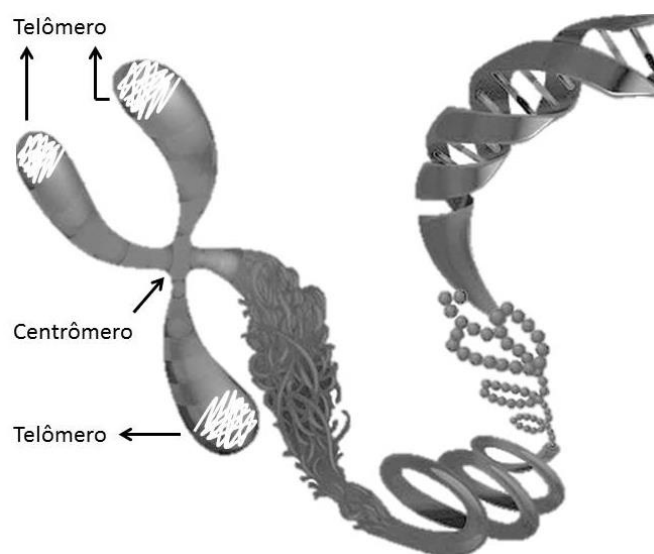


Figura 1. Composição do cromossomo eucariótico e localização dos telômeros. Adaptado de (NILSSON, 2014).

O número de repetições da sequência telomérica varia amplamente entre as espécies, apresentando alta conservação de sua sequência em organismos eucariotos (NELSON; SHIPPEN, 2012) desde 4,5 repetições  $G_4T_4$  no ciliado *Oxytricha nova*, até 350-500 pares de base (bp) em *Saccharomyces cerevisiae*. Em mamíferos, a sequência de nucleotídeos dos telômeros é formada pelo hexâmero TTAGGG, sendo que o número de repetições também é variável (Figura 2B). Em humanos, o número de repetições pode variar entre 10-15 quilobases (kb), e em roedores, o número de repetições é maior, entre 20-50 kb (NANDAKUMAR; CECH, 2013).

Telômeros têm a função de proteger o genoma contra a degradação nucleolítica, recombinação espontânea, eventos de reparo que ocasionem fusão cromossômica e rearranjo das quebras de fita dupla da sequência de DNA (SHAMMAS, 2011), além de auxiliar no posicionamento cromossomal e regular a capacidade replicativa celular (MEEKER et al., 2002), conferindo estabilidade cromossômica e manutenção da homeostase genômica.

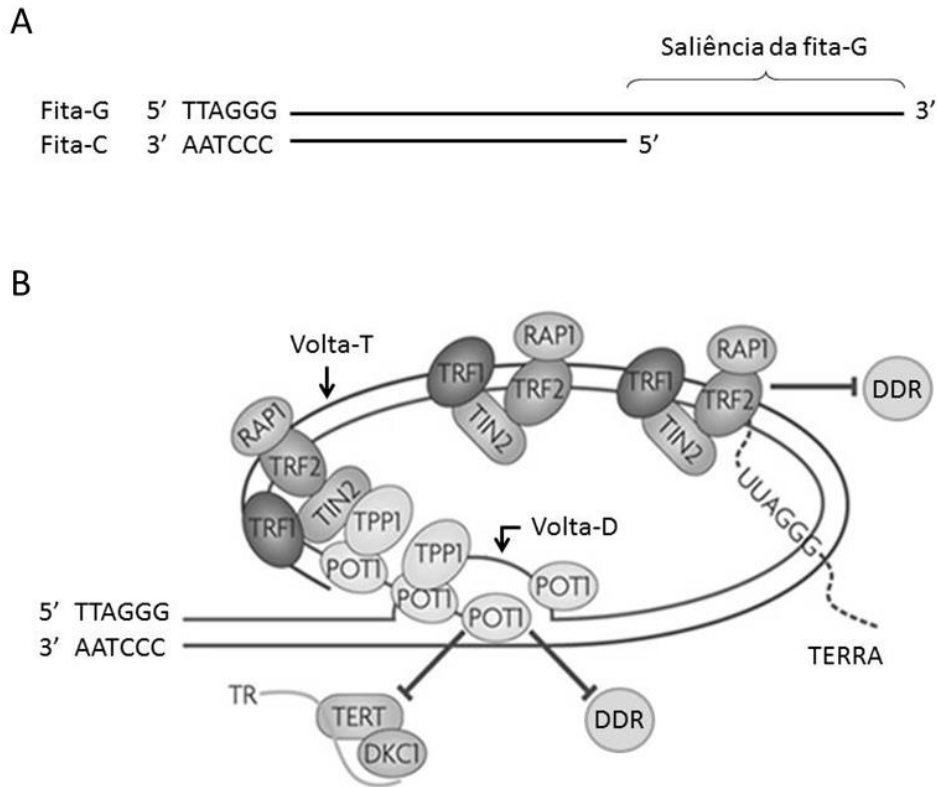


Figura 2. Estrutura dos telômeros de mamíferos. A) Caracterização da saliência da fita-G, em relação à fita-C. B) A interação da sequência telomérica com as proteínas do complexo *Shelterin* estabilizam a formação da volta-T e volta-D, impedindo o reconhecimento da saliência da fita-G como quebra de fita simples . Adaptado de (O'SULLIVAN; KARLSEDER, 2010).

#### 1.1.2.1. Replicação telomérica

O genoma de organismos eucariotos é composto por moléculas lineares de DNA que se condensam, em associação com histonas, formando cromossomos individuais – a morfologia e o número de cromossomos geralmente são espécie-específicos (ZHDANOVA; MININA IU; RUBTSOV, 2012). A fim de manter e preservar o genoma original durante a proliferação, a célula tem de executar um mecanismo de replicação completo dos telômeros, impedindo que sejam reconhecidos como quebras de DNA – originando cromossomos

dicêntricos por recombinação gênica. Por outro lado, se os telômeros não são completamente replicados, parte de alguns genes vitais podem ser perdidos a cada divisão celular (FOULADI et al., 2000).

A enzima DNA polimerase utiliza a fita molde de DNA para sintetizar a molécula filha complementar sempre no sentido 3'→5' do DNA. Devido ao processo de replicação celular ser semiconservativo, telômeros de organismos eucariotos terminam com protrusões em ambas as extremidade 3'OH dos cromossomos (HUG; LINGNER, 2006).

Dessa forma, o processo de duplicação de DNA não é homogêneo. A fita contínua (*leading strand*), que se estende no sentido 5'→3' durante o processo de formação da bolha de replicação (originada pela atividade de helicases), é duplicada continuamente. Já a fita descontínua (*lagging strand*), que se estende no mesmo sentido, é duplicada no sentido oposto à formação da bolha de replicação, resultando em uma replicação descontínua – sintetizando a nova fita em pequenos fragmentos de DNA a partir do anelamento de vários iniciadores de ácido ribonucleico (RNA), que se alongam gerando fragmentos de nucleotídeos, denominados fragmentos de Okasaki. Esses fragmentos começam a ser sintetizados após a bolha de replicação atingir uma extensão razoável, contribuindo para a replicação tardia da fita descontínua (*lagging*). Os iniciadores de RNA são sistematicamente degradados e substituídos por fragmentos de DNA pela atividade da enzima exonuclease 5'→3' (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2011; BONATO, 2004). Porém, a maquinaria de replicação do DNA gera uma protrusão na extremidade 3'OH da fita descontínua ao final do processo, pela incapacidade da DNA polimerase replicar completamente a fita descontínua, uma vez que o fragmento de Okasaki não possui molde, ocasionado pela formação de um *gap*, após a degradação do iniciador de RNA (CHAI et al., 2006) (Figura 2A).

Esse processo celular natural denominado problema final de replicação foi descrito primeiramente por Jim Watson, o qual percebeu a perda progressiva de nucleotídeos na

extremidade 3'OH dos cromossomos, a cada divisão celular (WATSON, 1972). O número de nucleotídeos que é removido a cada divisão celular não é constante, uma vez que depende de alguns fatores, como a posição e o tamanho da sequência de nucleotídeos do último iniciador de RNA que serve como molde para o início da síntese da nova fita de DNA, além do tempo de extensão da nova sequência (WELLINGER, 2014).

### **1.1.3. Marcador de idade biológica**

Dessa forma, o processo natural de encurtamento da sequência telomérica pode representar o ritmo do processo de envelhecimento, podendo ser comparado a um “relógio mitótico”, refletindo a história proliferativa celular (SHAMMAS, 2011). Essa definição sugere que o comprimento de telômeros poderia ser considerado um marcador de idade biológica alternativo, tanto a nível celular quanto sistêmico, refletindo o organismo. Dessa forma, o encurtamento acelerado da sequência telomérica poderia ser denominado como um potencial biomarcador relacionado à aceleração do processo de envelhecimento (BUTT et al., 2010).

A homeostase da estrutura telomérica é espécie-dependente e tecido-específica, variando sua taxa de encurtamento com a idade e entre os cromossomos de um mesmo indivíduo (FORSYTH; WRIGHT; SHAY, 2002). Durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados, o comprimento dos telômeros se mantém constante na maioria dos tecidos pela ação da enzima telomerase. Entretanto, após o nascimento, telômeros de células somáticas sofrem encurtamento progressivo, a cada divisão celular, devido ao silenciamento da enzima (MONAGHAN; HAUSSMANN, 2006). Alguns tecidos, como células de mucosa intestinal e células de sangue periférico têm alto nível de renovação, acarretando em uma alta taxa de proliferação celular, contribuindo para o encurtamento acelerado de seus telômeros. Já tecidos

com menor taxa de renovação, como cérebro e células musculares, apresentam comprimento de telômeros mais estáveis (TAKUBO et al., 2002).

A perda sucessiva de nucleotídeos a cada replicação celular é um processo fisiológico. Porém, ao atingir um comprimento crítico, induz sinais de resposta ao dano ao DNA (DDR), resultando na saída da célula do ciclo celular e induzindo a cascata de senescência celular (PRESCOTT et al., 2012). A parada do ciclo celular é estabilizada por sinais que ativam as vias metabólicas do gene supressor tumoral p53, induzindo a transcrição de gene inibidor da atividade de cinases dependentes de ciclina (p21). A transcrição do gene p21 ativa o oncogene proteína de retinoblastoma (pRb), limitando o mecanismo proliferativo, denominado estágio 1 de mortalidade (M1) (GOMEZ et al., 2012). Embora as células permanecerem metabolicamente ativas, elas não continuam seu ciclo proliferativo, adquirindo características apoptóticas (SHAY; WRIGHT, 2005). Ao alcançar o estágio M1, as células previnem a propagação de mutagênese, impedindo o desenvolvimento tumoral (STEWART; WEINBERG, 2006). Dessa forma, a capacidade das células somáticas proliferarem até atingirem um fenótipo senescente, iniciando a transcrição de genes que estimulariam a cascata apoptótica, deu origem ao termo Limite de Hayflick (SHAY; WRIGHT, 2000).

Todavia, a célula pode retomar sua taxa proliferativa pela supressão da via metabólica do gene p53, inativando a parada de seu ciclo, evitando a entrada no estágio senescente M1 (BURNS; RICHTER, 2008). Dessa forma, as células adquirem capacidade proliferativa ilimitada, de modo que seus telômeros encurtem até atingir um momento crítico, incapazes de proteger a extremidade dos cromossomos, resultando no surgimento de anomalias cromossômicas, como fusão de quebras de fitas de DNA e pontes de anáfase. Nesse ponto, as células alcançam o estágio 2 de mortalidade (M2), apresentando altas taxas de apoptose decorrentes da instabilidade genômica (ZOU et al., 2009) (Figura 3).

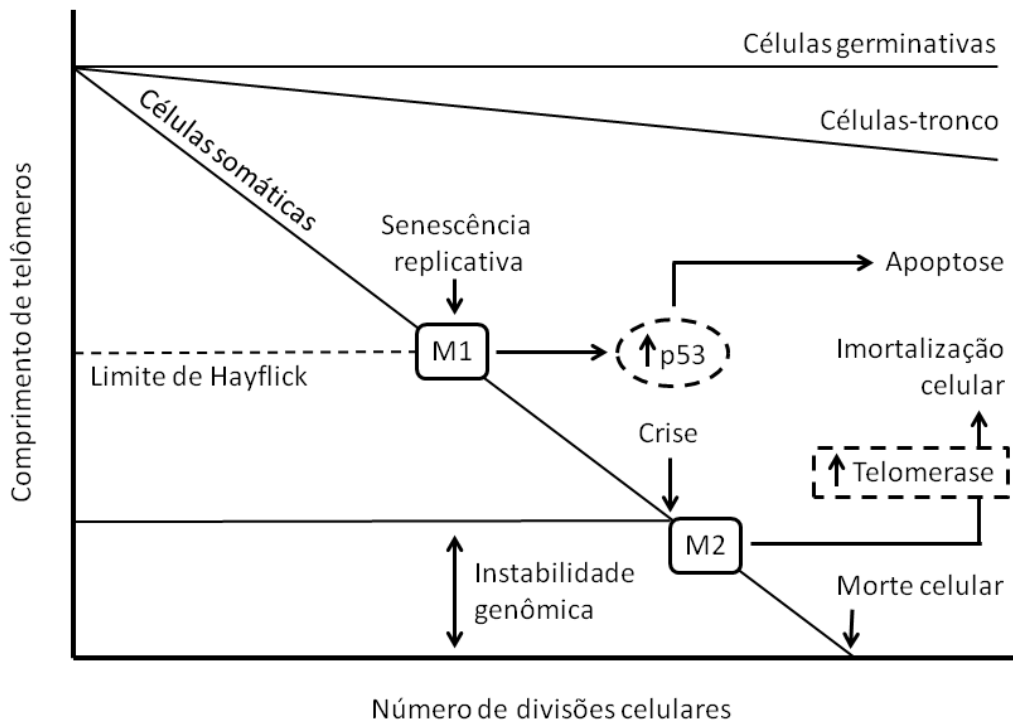


Figura 3. Encurtamento de telômeros controla a capacidade proliferativa de células somáticas. Adaptado de (LONDONO-VALLEJO, 2004).

#### 1.1.3.1. Telomerase

No início da década de 1970, Olovnikov levantou a hipótese de que uma enzima especial poderia ser capaz de compensar a perda de nucleotídeos resultantes do problema final de replicação (OLOVNIKOV, 1971). Essa enzima, denominada telomerase, foi descoberta em 1987 por Greider e Blackburn (GREIDER; BLACKBURN, 1987). A telomerase é uma enzima com atividade transcriptase reversa especializada, responsável pela síntese *de novo* do DNA telomérico, sendo o principal mecanismo fisiológico pelo qual as células de mamíferos estendem a sequência de seus telômeros. Em humanos, a telomerase adiciona a repetição do hexâmero TTAGGG à saliência 3'OH da fita-G, ao final dos cromossomos. (HUKEZALIE; WONG, 2013).

O núcleo catalítico da telomerase é um complexo ribonucleoproteico composto por uma subunidade polipeptídica transcriptase reversa da telomerase (TERT), e um RNA molde da telomerase (TR), a qual pertence à família de RNA's não codificantes (RUBTSOVA et al., 2012). A atividade da telomerase age como uma resposta ao encurtamento de telômeros associado com a replicação celular e eventos de degradação ao DNA (BLACKBURN, 2001). Além disso, o complexo da telomerase contém vários componentes adicionais que asseguram a atividade *in vivo* da enzima. As proteínas do complexo *Shelterin* estão intimamente ligadas à regulação da enzima, como a interação de TIN2 com TPP1, recrutando a atividade da telomerase. Depois disso, o dímero formado pelas proteínas TPP1 e POT1 se alinha a enzima, a fim de auxiliar na extensão da sequência telomérica em determinados momentos do ciclo celular. Outras proteínas também podem associar-se ao complexo, regulando a sua atividade (GALLARDO et al., 2011). O complexo da telomerase também contém a proteína disquerina (DK1) ligante ao RNA, que interage com domínios específicos de RNA's não codificantes, como no complexo da telomerase, conferindo estabilidade à estrutura (MATERA; TERNS; TERNS, 2007).

A biogênese e a maturação do complexo da telomerase, formado por suas duas principais subunidades, ocorrem por uma série de associações com proteínas e domínios específicos no corpo Cajal (RUBTSOVA et al., 2012) – que são organelas nucleares altamente conservadas especializadas na maturação de ribonucleoproteínas (NANDAKUMAR; CECH, 2013). Ao final da maturação, a subunidade TR possui um molde para extensão dos telômeros de 451 nucleotídeos (EGAN; COLLINS, 2012). Após a montagem da holoenzima funcional, as proteínas TIN2 e TPP1 do complexo *Shelterin* são responsáveis pelo recrutamento da telomerase até a região 3'OH da fita-G (Figura 4), processo facilitado pela proteína da telomerase acessória ao corpo Cajal-1 (TCAB1), localizada no corpo Cajal (EGAN; COLLINS, 2012).

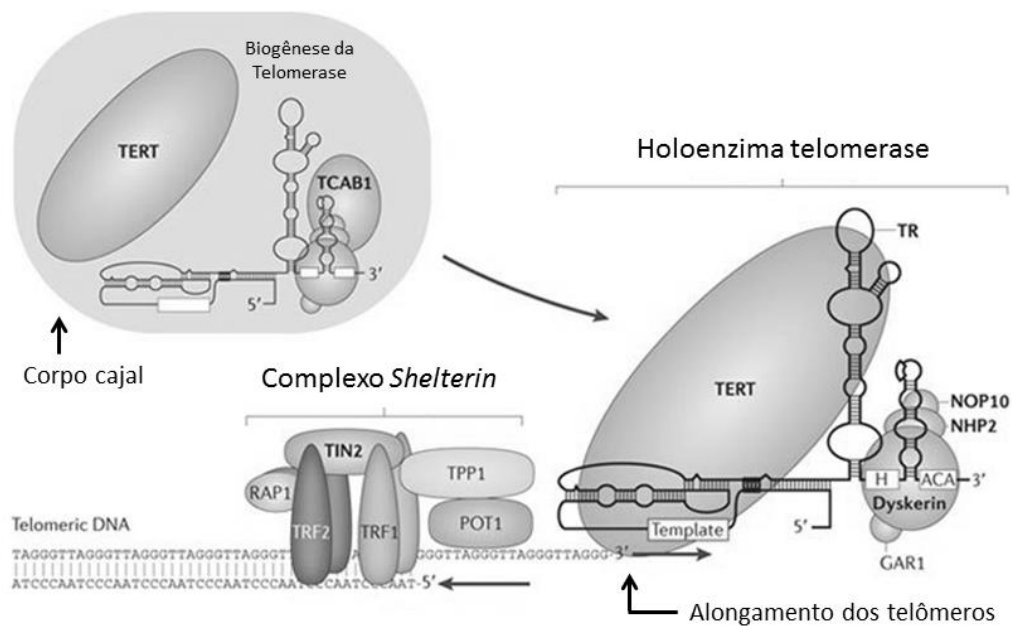


Figura 4. A biogênese do complexo da telomerase inicia no corpo Cajal, em associação com a proteína TCAB1. A holoenzima é constituída por duas subunidades, uma enzima transcriptase reversa (TERT) e um componente de RNA molde (TR). A estrutura telomérica é estabilizada pelo complexo *Shelterin*, composto por seis proteínas com afinidade à sequência. Adaptado de (ARMANIOS; BLACKBURN, 2012).

A principal atividade da telomerase garante o alongamento dos telômeros dependente de RNA. O ciclo catalítico da telomerase é composto de várias etapas sequenciais. Uma repetição TTAGGG é adicionada após a ligação do substrato. O produto resultante pode dissociar-se do sítio ativo da enzima, ou ser submetido à translocação, seguido de alongamento (AUTEXIER; LUE, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que o complexo formado por POT1 e TPP1 pode interagir com a telomerase, inibindo sua atividade quando se liga a região 3'OH terminal da subunidade TR (WANG, J. et al., 2007).

A telomerase não é ativa em todas as células, embora a subunidade TR esteja presente no citoplasma de todas as células, enquanto a subunidade TERT está presente em alguns tipos celulares, encontrada principalmente nas mitocôndrias (RUBTSOVA et al., 2012).



Em mamíferos, a telomerase está ativada em células embrionárias, e o comprimento dos telômeros se mantém a um nível constante, acarretando em um poder de divisão ilimitado. Células-tronco embrionárias são caracterizadas por possuírem uma atividade reduzida da telomerase, permitindo uma compensação parcial do encurtamento de seus telômeros. As células somáticas são, geralmente, caracterizadas pela ausência da atividade da telomerase, implicando em uma capacidade proliferativa limitada (RUBTSOVA et al., 2012) (Figura 3).

#### 1.1.3.1.1. Associação com doenças em mamíferos

O comprimento dos telômeros, a atividade da enzima telomerase e a associação das proteínas do complexo *Shelterin* ao DNA telomérico são fatores fundamentais na fisiopatologia das doenças humanas. Doenças relacionadas com a idade e síndromes de envelhecimento precoce são caracterizadas por acarretarem encurtamento acelerado de telômeros, podendo comprometer a viabilidade das células. Dessa forma, uma série de estratégias terapêuticas se baseia na manutenção do comprimento de telômeros e no mecanismo de ação da telomerase (BLASCO, 2005).

A disqueratose congênita (DC) é uma doença hereditária rara, caracterizada pela tríade pigmentação reticulada da pele, distrofia ungueal e leucoceratose em mucosas, além de alterações neurológicas, pulmonares e esqueléticas. A falência medular é a principal causa de morte. A DC foi a primeira patologia para a qual se estabeleceu um papel inequívoco causal entre disfunção telomérica e o desenvolvimento da doença (MITCHELL; WOOD; COLLINS, 1999). Análises moleculares revelaram mutações no gene da disqueratose congênita 1 (*dkc1*), que codifica para a proteína disquerina (DKC1), componente essencial da maquinaria de replicação do complexo telomérico. As mutações resultam na diminuição da atividade da telomerase e no encurtamento de telômeros (BLASCO, 2005). Outras doenças, como a

anemia aplásica e a fibrose pulmonar idiopática, estão associadas a mutações nas duas subunidades TERT e TR, e têm como consequência a deficiência na atividade da telomerase. Anemia aplásica é caracterizada pela pancitopenia sanguínea devido à hematopoiese insuficiente e medula óssea apresentando déficit de células, além de altas quantidades de células de gordura. Aberrações cromossômicas, como monossomia no cromossomo 7 são frequentes nessa doença. Já a fibrose pulmonar idiopática é uma doença letal progressiva crônica caracterizada por dispneia, escarros – principalmente devido a danos aos alvéolos. O encurtamento progressivo dos telômeros causa uma renovação celular acelerada levando a senescência celular prematura, especialmente de células epiteliais alveolares (KONG; LEE; WANG, 2013).

Embora a DC, a anemia aplásica e a fibrose pulmonar idiopática sejam doenças aparentemente diferentes com diversas manifestações clínicas, todas elas apresentam a característica de telômeros encurtados. Ainda, a observação de que indivíduos com fibrose pulmonar idiopática com mutações na subunidade da TERT induzem manifestações clínicas progressivas e mais severas, como anemia aplásica e DC nas gerações subsequentes, ilustra o conceito de doenças agrupadas no “Espectro da Síndrome Telomérica” (ARMANIOS; BLACKBURN, 2012). Assim, fenótipos heterogêneos são causados pelos mesmos defeitos moleculares ou mutações subjacentes nos genes do complexo telomérico.

O encurtamento acelerado de telômeros tem sido relacionado a diversas síndromes metabólicas e inflamatórias, como doenças cardiovasculares (SANDERS et al., 2012), aterosclerose, diabetes mellitus, (SALPEA; HUMPHRIES, 2010), entre outras. Tais doenças sofrem modulação por diversos fatores externos, como estresse oxidativo e inflamação sistêmica, acarretando no encurtamento da sequência telomérica (KONG et al., 2013).

Estudos demonstram que fatores associados ao estilo de vida, como tabagismo (SALIHU et al., 2015), alcoolismo (PAVANELLO et al., 2011), exposição à poluição

ambiental (ZHANG et al., 2013), ingestão de bebidas açucaradas (LEUNG et al., 2014), obesidade (KIM et al., 2009), status socioeconômico (NEEDHAM et al., 2012), bem como outras doenças associadas à inflamação crônica, além de eventos de estresse bioquímico (COLUZZI et al., 2014) ou psicológico (CHAE et al., 2014) influenciam diretamente na saúde e na expectativa de vida dos indivíduos, podendo potencialmente acelerar a taxa de encurtamento dos telômeros, aumentar o risco de desenvolver certos tipos de câncer, e o ritmo de envelhecimento, levando a senescência ou morte celular (SHAMMAS, 2011) (Figura 5).

O reflexo da exposição a situações adversas sobre o comprimento de telômeros pode ser detectado ainda na infância. Estudos demonstram associação entre encurtamento dos telômeros e a ocorrência de obesidade infantil (BUXTON et al., 2011), além de estar relacionados com o baixo nível socioeconômico (NEEDHAM et al., 2012), e exposição a estresse psicológico (DRURY et al., 2012). Em um estudo longitudinal, que acompanhou crianças expostas à violência durante cinco anos, houve persistência do encurtamento de telômeros, sugerindo que eventos no início da vida podem causar alteração crônica, aumentando o risco de doenças na idade adulta (SHALEV et al., 2013). Estudos demonstram que a ruptura prematura de membranas está relacionada com o encurtamento de telômeros de leucócitos já no período fetal (MENON et al., 2014; MENON et al., 2012). Além disso, há evidências de que eventos adversos ainda durante a gestação podem estar associados à telômeros mais curtos no recém-nascido (ENTRINGER et al., 2013), e em adultos jovens (ENTRINGER et al., 2011) (Figura 5).

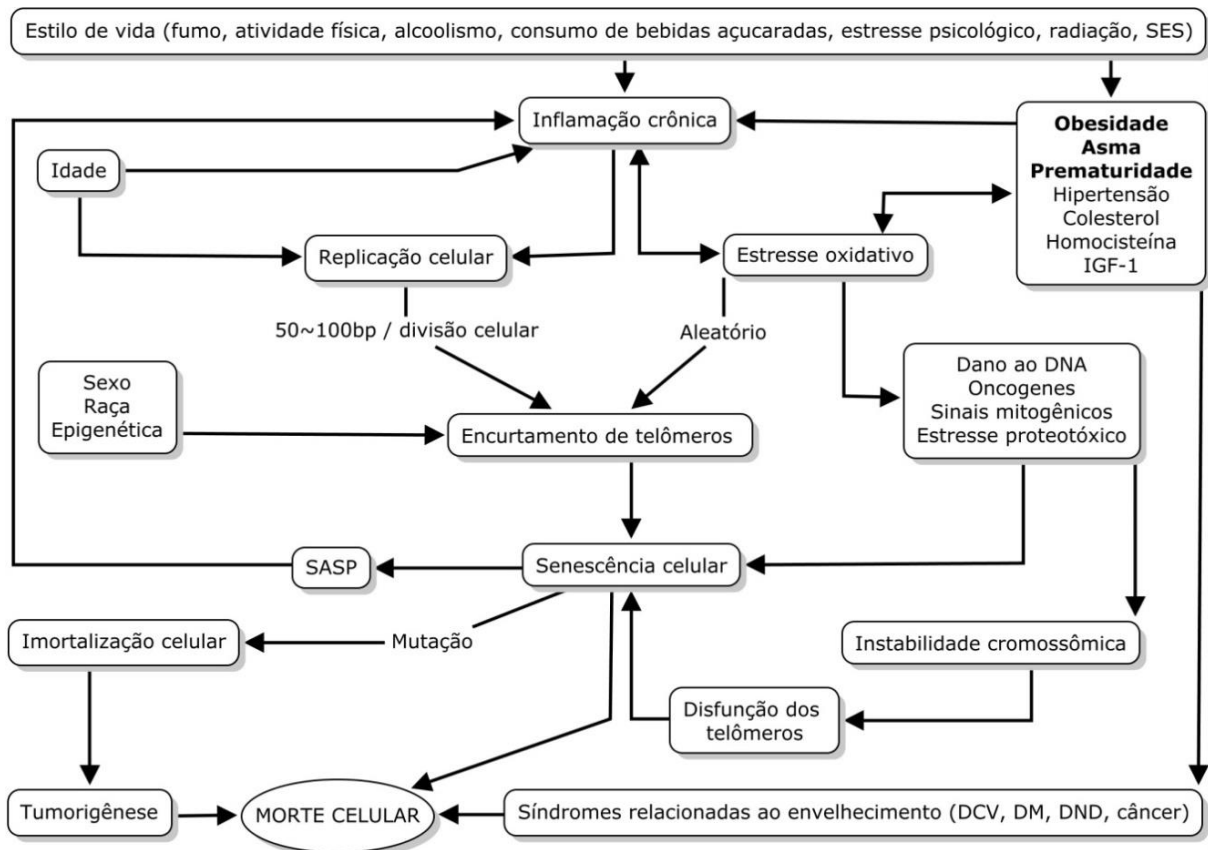


Figura 5. Mapa conceitual do estudo de comprimento de telômeros e morte celular. IGF-1 = Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; SASP = Fenótipo secretor associado ao estado senescente; DCV = Doenças cardiovasculares; DM = Diabetes mellitus; DND = Doenças neurodegenerativas; SES = Status socioeconômico. Adaptado de (GLEI et al., 2014).

#### 1.1.4. Determinação do comprimento de telômeros

A descoberta de que o encurtamento da sequência telomérica está associado com muitas condições de saúde, e que a estrutura molecular pode ser alterada em função das exposições socioambientais, têm ressaltado a necessidade do desenvolvimento de métodos precisos e objetivos a fim de quantificar o comprimento dos telômeros. Sendo assim, múltiplas técnicas têm sido desenvolvidas para a análise e monitoramento do encurtamento de

telômeros, de forma que o estudo sobre a homeostase da sequência telomérica tornou-se uma importante ferramenta na elucidação do processo de envelhecimento (MONTPETIT et al., 2014).

A quantificação do comprimento dos telômeros pode ser realizada de várias formas. Entretanto, as diversas técnicas apresentam vantagens e limitações, as quais devem ser ponderadas no planejamento do desenho experimental. Uma importante limitação reside no fato de que em uma determinada célula humana somática em metáfase existem 92 telômeros, cada um com um comprimento único. Todavia, a maioria das técnicas disponíveis analisa uma população de células heterogêneas e não uma única população celular, de forma que o resultado reflete uma medida heterogênea da média de uma população de telômeros nas células analisadas.

#### 1.1.4.1. *Southern Blot*

O primeiro método para quantificação absoluta média do tamanho de telômeros proposto foi baseado na técnica de *Southern Blot*, adaptado para detecção da distribuição do comprimento de fragmentos de restrição terminais (TRF) (KIMURA et al., 2010).

Nessa técnica, o DNA é digerido por enzimas de restrição e separado por diferença de peso molecular por eletroforese, seguido de hibridização radioativa com sonda específica para a sequência telomérica em membrana de nitrocelulose. Dessa forma, o tamanho dos fragmentos de restrição terminais dos telômeros é quantificado por densitometria. Contudo, a dificuldade de obtenção de DNA fragmentado – tendo em vista o peso molecular elevado e a viscosidade do DNA – bem como a grande quantidade de material genético necessário para executar a técnica (na ordem de microgramas), levou os pesquisadores a estabelecer técnicas alternativas de determinação do comprimento de telômeros (LIN; YAN, 2005).

Além disso, quando a análise é realizada em tecidos, há perda de informação, visto que a detecção não é individual – combinando diferentes tipos celulares, não permitindo estabelecer o número exato de repetições teloméricas, devido à concomitante detecção de regiões subteloméricas (em razão da atividade das enzimas de restrição), que são altamente variáveis (MONTPETIT et al., 2014).

Outra desvantagem do método TRF, assim como de outros métodos de detecção de telômeros, é que a análise final fornece a média do comprimento de telômeros de cada amostra – no caso de humanos em condições normais, 92 telômeros provenientes de 23 pares de cromossomos, – não proporcionando informações individuais do comprimento de cada cromossomo (MONTPETIT et al., 2014).

Embora considerada padrão ouro, seu processo altamente laborioso é visto como outra grande limitação. Assim, o número de amostras que podem ser analisadas para a execução de estudos epidemiológicos torna-se limitado.

#### 1.1.4.2. *Q-FISH, Flow-FISH e PRINS*

Hibridização fluorescente quantitativa *in situ* (Q-FISH) é uma técnica citogenética baseada na quantificação da sequência telomérica por microscopia de fluorescência, utilizando um peptídeo de ácido nucleico (PNA) composto pelos nucleotídeos 3'(CCCTAA)<sub>3</sub>5', específico para hibridizar com a sequência dos telômeros. Essa técnica utiliza as características físicas dos PNA's, no que se refere a suas baixas forças iônicas, sendo capazes de se anelar com a fita complementar do DNA telomérico, quantificando a sequência alvo individualmente de cada cromossomo durante a metáfase do ciclo celular (BAERLOCHER et al., 2006).

A técnica de determinação do comprimento dos telômeros por *Q-FISH* foi adaptada para análise de células em suspensão por citometria de fluxo (RUFER et al., 1998). Esse método foi utilizado para demonstrar o encurtamento do DNA telomérico em células nucleadas sanguíneas humanas nos primeiros anos de vida, a fim de demonstrar que a taxa de erosão dos telômeros de linfócitos era maior, em comparação com granulócitos (RUFER et al., 1999). A técnica de hibridização fluorescente *in situ* por citometria de fluxo (*Flow-FISH*) também foi utilizada para estudar o comprimento de telômeros de leucócitos de babuínos durante seu envelhecimento (BAERLOCHER et al., 2003), entre outros estudos.

Adaptações posteriores aperfeiçoaram a técnica, incluindo a automação parcial do procedimento de análise, como inclusão de células com tamanho previamente estabelecido de telômeros, permitindo análises comparativas com outros grupos celulares. A análise multicolor automatizada da técnica de *Flow-FISH* é amplamente utilizada, devido a sua sensibilidade, na determinação do comprimento médio de telômeros em células humanas do sistema imune (BAERLOCHER; LANSDORP, 2003). Ao longo do tempo, essa técnica começou a ser utilizada na identificação de pacientes portadores de diversas doenças resultantes de anomalias hereditárias relacionadas a genes da enzima telomerase. Porém, a maior limitação da técnica é em relação à quantidade de material genético necessário para a quantificação da sequência telomérica, inviabilizando o uso dessa técnica em estudos epidemiológicos (LY et al., 2005).

A técnica de *Flow-FISH* utiliza, além de um PNA específico para hibridizar com telômeros, uma sonda conjugada a um marcador fluorescente, que hibridiza quantitativamente a sequência telomérica (DERRADJI et al., 2005). A sonda de PNA hibridiza especificamente com o DNA telomérico em uma interação mais estável que a re-hibridização das fitas complementares de DNA (LAUZON et al., 2000). Com a padronização da técnica no citômetro de fluxo, é possível definir (através da quantidade de sondas hibridizadas na

sequência do DNA alvo) o comprimento de telômeros em unidades de base. Além disso, essa técnica permite que o tamanho dos telômeros seja estimado excluindo as regiões subteloôméricas, indicando a sensibilidade de técnica (SALDANHA; ANDREWS; TOLLEFSBOL, 2003).

Uma variação da técnica *FISH* foi recentemente desenvolvida, denominada *primed in situ (PRINS)*, com a finalidade de substituir a sonda de PNA convencional por uma marcação por nucleotídeos fluorescentes, e posterior amplificação da sequência alvo por técnicas moleculares com iniciadores para sequência de telômeros (MONTPETIT et al., 2014). Existem na literatura poucos trabalhos utilizando essa metodologia.

#### 1.1.4.3. *Hybridization Protection Assay*

É um teste enzimático baseado em uma técnica por emissão de sinal quimioluminescente. O método que envolve a comparação por uma razão entre repetição da sequência telomérica e a sequência de repetições do elemento Alu – utilizando uma sonda DNA-específica. A maior vantagem dessa técnica é sua velocidade, além de não requerer grandes quantidades de DNA ultrapuro. A limitação do método é justamente em relação à interpretação dos resultados, uma vez que há grande variação do tamanho e o número de repetições do elemento Alu entre os indivíduos (MONTPETIT et al., 2014).

#### 1.1.4.4. Quantificação da saliência 3'OH de fita simples

Além de métodos baseados na quantificação do tamanho total da sequência telomérica, também se desenvolveu um método específico para medir a saliência 3'OH de fita simples, na extremidade dos telômeros. Esse método utiliza várias técnicas de detecção, como ensaios de



hibridização da fita-G, microscopia eletrônica da saliência de fita simples, oligonucleotídeos específicos para a sequência telomérica, nucleases específicas para DNA de fita dupla, entre outros (ZHAO et al., 2008). Essa técnica se baseia no estudo estrutural da sequência telomérica, tendo diferentes aplicações, quando comparada às técnicas convencionais (MONTPETIT et al., 2014).

Porém, uma restrição dessa técnica é a relativa ineficiência das nucleases para a remoção da saliência 3'OH de fita simples, não permitindo detectar com precisão a sequência de DNA correspondendo à porção final da estrutura telomérica (CIMINO-REALE et al., 2001). Além disso, a existência de pequenas saliências também pode ser proporcional ao número de células que tenham entrado a senescência celular (STEWART et al., 2003), de forma que os resultados não são claros a respeito de que a presença de saliências curtas significa um lento encurtamento dos telômeros ou abundância de células senescentes (NAKAGAWA; GEMMELL; BURKE, 2004).

#### 1.1.4.5. PCR em tempo real

A fim de superar barreiras, como a quantidade de DNA genômico (gDNA) e a necessidade de padronizar técnicas de triagem de alto rendimento (*high-throughput screening*), foram desenvolvidas técnicas baseadas na amplificação da sequência de telômeros a partir de uma pequena quantidade de gDNA pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Essa técnica permite que a sequência de interesse (amplicon), definida por um par de oligonucleotídeos iniciadores de DNA, seja duplicada a cada ciclo. A reação consiste em três etapas de 20-40 ciclos, denominadas desnaturação do DNA, anelamento das sequências iniciadoras à sequência alvo a ser amplificada, e extensão ou polimerização pela enzima *Taq* DNA polimerase. Ao final da reação o produto final (ou

amplicon) pode ser quantificado, geralmente por meio da detecção de fluorescência de um fluoróforo intercalante de DNA de fita dupla. Durante a reação, a quantidade de fluorescência emitida é mensurada, permitindo que a quantidade inicial do material genético possa ser calculada (DING; CANTOR, 2004).

#### 1.1.4.5.1. Quantificação relativa

Em 2002, Richard Cawthon desenvolveu uma técnica baseado em qPCR para a quantificação das sequências dos telômeros. Cawthon desenvolveu uma estratégia molecular capaz de resolver uma grande limitação para a detecção de sequências teloméricas, devido à natureza repetitiva da sequência a ser amplificada. O autor desenhou oligonucleotídeos iniciadores com extremidades 5' não complementares com a sequência alvo, seguidas de 31 (oligonucleotídeo direto) ou 33 bases (oligonucleotídeo reverso), que hibridizam parcialmente com a sequência alvo (Figura 6) (CAWTHON, 2002).

A quantificação do comprimento relativo dos telômeros (rTL) é obtida através de duas reações de qPCR para cada amostra, sendo uma para amplificação da sequência telomérica (T) e outra para amplificação da sequência de um gene de cópia única (S, *single copy gene*) - gene normalizador definido como controle de amplificação, capaz de permitir o cálculo do número de cópias de genoma por amostra. Dessa forma, a razão T/S é calculada a fim de obter um valor que se correlaciona com o comprimento médio dos telômeros da amostra, em relação a uma população de estudo (CAWTHON, 2002).

A metodologia desenvolvida por Cawthon (CAWTHON, 2002) é, atualmente, a técnica de quantificação do comprimento de telômeros mais utilizada na pesquisa clínica epidemiológica (MONTPETIT et al., 2014).



uma estimativa do comprimento, em pares de bases, da sequência telomérica da amostra (O'CALLAGHAN; FENECH, 2011).

#### 1.1.4.6. *STELA*

Tendo em vista que um pequeno número de telômeros criticamente curtos pode servir como sinal para desencadear a cascata de senescência celular, levando a apoptose, alguns estudos podem se beneficiar de uma técnica capaz de detectar o comprimento individual de telômeros (ABDALLAH et al., 2009).

Dessa forma, Baird e colaboradores adaptaram o método de detecção de telômeros por PCR e desenvolveram a técnica de análise do comprimento único de telômeros (*STELA*) para um subgrupo de cromossomos (BAIRD et al., 2003). Esse método de detecção utiliza iniciadores específicos para a região subteloméricas de cada cromossomo, permitindo alta precisão de quantificação de telômeros. Porém, devido à complexidade da técnica, apenas um pequeno grupo de cromossomos atinge o critério necessário para o desenho de iniciadores específicos para sua região subtelomérica. Além disso, em alguns casos, como a variação na taxa de encurtamento de diferentes telômeros (até atingirem um tamanho crítico), essa técnica não se torna uma ferramenta apta para detectar a diferença entre esses encurtamentos individuais (MONTPETIT et al., 2014). Outra grande limitação dessa técnica é seu tempo de execução, tornando-se extremamente laboriosa (AUBERT; HILLS; LANSDORP, 2012).

## 2. **JUSTIFICATIVA**

O processo de envelhecimento precoce está associado com várias patologias, algumas com relação causal bem estabelecida entre disfunção telomérica e doenças degenerativas.

Adicionalmente, há evidências de que o encurtamento telomérico, ainda que em etapas iniciais do desenvolvimento, pode contribuir para o surgimento prematuro de processos comumente associados ao envelhecimento. Por tal motivo, existe um crescente interesse a fim de medir, de forma precisa e eficiente, o comprimento de telômeros em determinada situação ou condição e, assim, poder associar fatores que possam contribuir com a manutenção de sua estrutura ou com seu encurtamento fisiológico (ou acelerado), associado a diversas condições.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Padronizar e estabelecer uma técnica para a determinação do comprimento relativo de telômeros por qPCR (através da relação T/S), a partir de três tecidos diferentes – células epiteliais da face interna da mucosa oral, leucócitos e células mononucleares de sangue periférico.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o comprimento relativo de telômeros (razão T/S) em três grupos de indivíduos (crianças nascidas prematuramente, crianças portadoras de asma, e indivíduos adultos portadores de obesidade severa ou mórbida) e compará-los com seus respectivos controles;
- Correlacionar o tamanho de telômeros em indivíduos adultos portadores de obesidade com idade e o IMC.

## **PARTE II**

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Estudo epidemiológico analítico observacional, de caráter caso/controle.

### **4.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO**

#### **4.2.1. Crianças ex-prematuras**

##### **4.2.1.1. Critérios de inclusão**

A identificação, seleção e recrutamento das crianças ex-prematuras foi realizada pela médica neonatologista Helen Zatti na cidade de Caxias do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Marcus H. Jones, da PUCRS.

Os indivíduos participantes desse estudo foram classificados com base no cálculo da idade gestacional materna e divididos em dois grupos – grupo caso, composto por crianças nascidas prematuramente (< 37 semanas de gestação) e grupo controle, composto por crianças nascidas a termo ( $\geq$  37 semanas de gestação). O grupo caso foi constituído por 46 indivíduos nascidos de forma prematura, hoje com idade entre 8 e 12 anos, que foram convidados – juntamente com seus responsáveis – a participar do estudo. O grupo controle foi constituído por 45 crianças nascidas a termo, com a mesma idade, pareadas por sexo, que concordaram – juntamente com seus responsáveis – em participar do projeto.

#### 4.2.1.2. Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão residir, atualmente, em municípios que não façam parte de área de abrangência do estudo, e óbito.

#### 4.2.1.3. Coleta do material biológico

Foi retirado, por punção venosa, 1mL de sangue periférico e realizado um esfregaço na face interna da mucosa oral, a fim de obtenção de células epiteliais da mucosa oral. O material foi transportado refrigerado de Caxias do Sul ao Departamento de Bioquímica da UFRGS e processado nas próximas 24 horas.

### **4.2.2. Asmáticos**

#### 4.2.2.1. Critérios de inclusão

A identificação, seleção e recrutamento das crianças asmáticas foram realizados pela equipe clínica liderada pelos médicos Dr. Renato T. Stein, Dr. Marcus H. Jones e Dr. Paulo Márcio Pitrez, do Laboratório de Fisiologia Respiratória da PUCRS.

Os indivíduos foram classificados com base na avaliação de um questionário de rastreamento (ISAAC fase I), que foi enviado aos domicílios, para preenchimento pelos responsáveis, com perguntas sobre asma. A partir das respostas, os indivíduos foram identificados e classificados em três grupos: portadores de asma (leve ou moderada), asma severa e não asmáticos. O grupo caso foi composto por 123 crianças portadoras de asma leve ou moderada, com idade entre 8 a 14 anos. O grupo controle foi selecionado na proporção 2:1



(pareados com seus respectivos indivíduos asmáticos), composto por 73 crianças saudáveis. O terceiro grupo foi composto por 17 crianças portadoras de asma severa, na mesma faixa etária.

#### 4.2.2.2. Critérios de exclusão

A análise dos questionários, referentes a sintomas da função pulmonar afetada, foi a ferramenta utilizada para a decisão do enquadramento no estudo.

#### 4.2.2.3. Coleta do material

Foram retirados 10mL, por punção venosa, de sangue periférico. Desse volume, 1mL de sangue total foi armazenado a -20°C até seu uso. O material permaneceu estocado a -20°C pelo período de 18-24 meses.

### **4.2.3. Obesidade severa**

#### 4.2.3.1. Critérios de inclusão

A identificação, seleção e recrutamento dos indivíduos participantes foram realizados pela equipe médica liderada pelo Dr. Claudio Corá Mottin e Dr. Alexandre V. Padoin, e executada pela médica Letícia B. Alves do Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) da PUCRS.

Os indivíduos participantes desse estudo foram classificados com base no cálculo do IMC e a avaliação de um questionário sobre a qualidade de vida (FACES III) (anexado ao final da dissertação). Os indivíduos foram divididos em dois grupos, de acordo com a

Organização Mundial da Saúde – grupo caso, composto por 39 indivíduos com obesidade severa ( $IMC \geq 35,0$ ) ou mórbida ( $IMC \geq 40,0$ ) e grupo controle, composto por indivíduos eutróficos ( $18,5 \geq IMC \geq 24,99$ ) (WHO, 2011). Indivíduos com idade entre 18 e 65 anos foram recrutados no Hospital São Lucas da PUCRS no período transoperatório de cirurgia bariátrica compuseram o grupo formado por portadores de obesidade. O grupo controle foi constituído por 27 indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 65 anos, que realizavam exames de rotina e que concordaram em participar do estudo.

#### 4.2.3.2. Critérios de exclusão

Indivíduos postulantes ao grupo controle portadores de comorbidades associadas à obesidade, como síndrome metabólica, cardiopatias e doenças respiratórias, bem como consumidores crônicos de álcool ou tabaco (ativo ou passivamente), e aqueles que tenham sofrido de câncer foram excluídos do estudo.

#### 4.2.3.3. Coleta do material

Após o preenchimento dos questionários, foi solicitado aos pacientes a permissão para a coleta de 10mL de sangue periférico. As coletas foram realizadas por uma equipe treinada durante o período transoperatório, no ambulatório de cirurgia Bariátrica e Metabólica do Hospital São Lucas da PUCRS (COM HSL PUCRS), coordenado pelo Dr. Cláudio Corá Mottin, MD PhD (em anexo ao final da dissertação, a carta de permissão para a realização das coletas no COM HSL PUCRS, assinada pelo Dr. Cláudio Corá Mottin).

## 4.3. TÉCNICAS

### 4.3.1. Material biológico

#### 4.3.1.1. Purificação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

O sangue colhido dos pacientes foi dispensado em tubos de 15 mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo homogeneizado por inversão. Em seguida, o sangue foi cuidadosamente repassado para novos tubos de 15 mL contendo uma fase de Histopaque<sup>®</sup>-1077 (densidade: 1,077 g/mL, Sigma Aldrich, EUA) na razão de 1:1 e então, centrifugado a 400 xg por 30min, sem freio. Após a centrifugação por densidade, as PBMC foram coletadas, lavadas e ressuspensas em solução salina fosfato-tamponada Dulbecco (DPBS). O rendimento e a viabilidade celular foram determinados pela contagem em hemocítmetro, com o corante Azul de Tripán (Sigma Aldrich, EUA), em um microscópio de contraste de fase.

### 4.3.2. Extração de DNA genômico

Três métodos diferentes de extração de gDNA foram utilizados durante a execução desse projeto, visando comparar os métodos de extração na obtenção do gDNA com alta pureza – ou seja, com o mínimo contaminante proteico, além de fenóis e carboidratos resultantes do processo de extração – e em quantidade suficiente para execução das análises moleculares. A leitura da concentração do gDNA e a pureza – estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280nm – de todas as amostras foi realizada no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf).

#### 4.3.2.1. Kit de extração PureLink® Genomic DNA

O método de extração de gDNA, a partir de células epiteliais da face interna da mucosa oral, utilizado no estudo dos ex-prematuros foi o kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, EUA), conforme instruções do fabricante.

#### 4.3.2.2. Kit de extração Qiagen FlexiGene DNA

O método de extração de gDNA, a partir de leucócitos, utilizado nos estudos dos pacientes asmáticos e dos ex-prematuros foi o kit comercial FlexiGene DNA Kit (Qiagen, USA), conforme instruções do fabricante.

#### 4.3.2.3. Método do Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

O método de extração de gDNA, a partir de PBMC, utilizado no estudo de pacientes com obesidade foi padronizado no nosso laboratório, baseado na técnica de extração pelo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) já descrita (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987).

Após purificação das PBMC, alíquotas de  $0,5 \times 10^6$  células foram separadas para a extração do gDNA. A extração do material genético foi realizada durante três dias, sendo que no primeiro dia as células foram lisadas com água ultrapura do tipo Milli-Q seguido por repetidas centrifugações de curta duração, lavadas em DPBS, e incubadas por 12-18 horas a 50°C em solução tamponada (constituído por 2% de Tween 20, EDTA 1mM e Tris-HCl 50mM) contendo Proteinase K (2mg/mL, Promega). No segundo dia, 800µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados à

solução a fim de precipitar o gDNA das amostras, durante a centrifugação a 14.000rpm. A fase aquosa (superior) foi coletada e incubada por 12-18 horas a -20°C em solução contendo 20% de acetato de sódio e 70% de álcool isopropílico. No terceiro dia, o gDNA foi centrifugado e ressuspendido em água ultrapura do tipo Milli-Q e estocado a 4°C.

#### **4.3.3. Avaliação do comprimento relativo de telômeros**

Para as reações de PCR, utilizamos 25ng de gDNA molde para a quantificação do rTL. Para cada amostra foram realizadas duas reações PCR em tempo real, em triplicata. Utilizamos pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) já publicados (CAWTHON, 2002). Estabelecemos uma curva padrão a partir da diluição seriada 1:10 de uma quantidade conhecida de um oligômero sintético de 84 bases (84-mer), contendo a sequência de nucleotídeos TTAGGG repetida 14 vezes para a reação de amplificação da sequência de telômeros (T) (O'CALLAGHAN; FENECH, 2011). Da mesma forma, estabelecemos um sistema similar para a construção de uma curva padrão para o gene constitutivo de copia única (S). As reações foram realizadas utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen, EUA), no aparelho StepOnePlus™ (Applied Biosystems). A especificidade das reações foi confirmada através da análise das curvas de dissociação (ao final de cada reação). Em todas as reações utilizamos dois controles em triplicata. Um controle negativo, incluído para detectar uma possível contaminação dos reagentes ou falso-positivo na ausência do gDNA. O segundo controle consistiu na inclusão de uma amostra aleatória, escolhida como referência. Esse controle foi, utilizado para monitorar a variação interplacas e permitir obter um fator normalizador a fim de comparar amostras de diferentes reações.

Os resultados referentes às amostras foram analisados somente quando a eficiência da reação foi 80-110%, e o coeficiente de regressão linear da curva padrão  $R^2 \geq 0,985$ . As

triplicatas com diferença  $\geq 0,5$  ciclos limiar (CT) foram descartadas e repetidas. Os resultados foram analisados pelo cálculo  $[2^{CT(\text{telômeros})}/2^{CT(36B4)}]^{-1}$ , denominado razão T/S (cada amostra relativa à média do grupo controle) (CAWTHON, 2002), utilizando o programa StepOne™ Software v2.2.2. (Applied Biosystems). A eficiência da reação foi calculada mediante a seguinte fórmula,  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ .

Para cada estudo foi calculado o coeficiente de variação (CoV)= Desvio padrão/Média.

#### 4.3.3.1. Reação para amplificação de telômeros (T) e do gene 36B4 (S)

Na amplificação da sequência dos telômeros (T), o iniciador direto pode hibridizar com qualquer trecho parcialmente complementar de 31bp disponível ao longo da sequência de DNA telomérico (orientado no sentido 5'→3') em direção ao centrômero do cromossomo. Da mesma forma, o iniciador reverso pode hibridizar com qualquer trecho parcialmente complementar de 33bp ao longo da fita de DNA (orientado no sentido 5'→3') em direção à extremidade do cromossomo (Figura 6) (CAWTHON, 2002). Para a amplificação da sequência telomérica, o programa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 22 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 54°C por 2 minutos, seguido da curva de dissociação.

Além da reação de amplificação da sequência telomérica, realizamos a amplificação de um gene autossômico de cópia única, que codifica para a fosfoproteína ácida de ribossomo P0 36B4 (RPLP0, número de acesso NM\_053275). Esse gene foi utilizado como controle endógeno da reação e determinação do número de cópias de genoma por amostra. Sua utilização já está amplamente validada em estudos de dosagem de genes (BOULAY et al., 1999). Para a amplificação da sequência do gene 36B4, o programa consistiu de um passo

inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto, seguido da curva de dissociação.

A composição da mistura, para cada amostra, foi idêntica para ambas as reações T e S, e foi constituído por 0,1 x SYBR®Green (Molecular Probes, EUA), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada dNTP, 1% de DMSO e 0,4U de *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen, EUA), com um volume final igual a 20µL.

Para a detecção dos produtos amplificados utilizou-se a molécula SYBR Green (Molecular Probes, EUA). SYBR Green é um fluoróforo intercalante com alta especificidade por DNA de fita dupla. Quando intercalado, emite fluorescência e permite a detecção do sinal durante a progressão do PCR, refletindo assim a quantidade de DNA amplificado a cada ciclo, em tempo real.

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.

Oligômero	Iniciadores		Tamanho esperado
	Direto (5' → 3')	Reverso (5' → 3')	
36B4	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	75pb
Telômeros	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGG GTGAGGGT	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCC TATCCCTATCCCTA	> 76pb*

\* Tamanho mínimo esperado dos fragmentos da sequência telomérica, observados em gel de agarose, devido à soma do tamanho dos iniciadores.

#### 4.3.3.2. Análise e documentação dos géis de agarose

Todas as reações de qPCR foram confirmadas em gel de agarose 3%. Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética horizontal em solução tamponada

TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA) na presença de 1x SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen, EUA) durante 30 minutos a 100V. Os géis foram iluminados com luz UV (302nm) em transiluminador e digitalmente documentados (Gelliance 200<sup>™</sup>, Perkin Elmer<sup>®</sup>, EUA).

#### 4.4. ESTATÍSTICA

##### 4.4.1. Tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base no livro Bioestatística: Princípios e aplicações, de autoria de Sídia Callegari-Jacques (CALLEGARI-JACQUES, 2007). Para isso, utilizamos um cálculo do  $n$  com a finalidade de comparar as médias (do comprimento de telômeros) de dois grupos independentes, baseado na fórmula:

$$n = \frac{s_A^2 + s_B^2}{(\mu_A + \mu_B)^2} x(t_\alpha + u_\beta)^2$$

A fórmula exige uma estimativa sobre a variância ( $s^2$ ) entre os parâmetros a serem detectados. Além disso,  $t^2$  é o valor da distribuição  $t$  de *Student* para o nível de significância bilateral que será utilizado na análise dos dados ( $t_{\alpha,gl}$ ). Além disso,  $u_\beta$  é o valor de  $t$  unilateral para o mesmo número de graus de liberdade correspondentes a  $\beta$ , isto é, 1 menos o poder desejado para o teste.

Com base em dados de outros estudos sobre a diferença entre o comprimento de telômeros entre dois grupos, obtivemos o valor do desvio padrão e a média dos dois grupos. A fim de encontrar uma diferença entre o grupo controle e o grupo experimental, calculamos



que seriam necessários 54 indivíduos (27 pacientes em cada grupo), assumindo um poder estatístico de 80% e um nível de significância de 5%.

#### **4.4.2. Testes estatísticos**

Os dados categóricos foram apresentados por frequência absoluta e relativa. As variáveis contínuas, mediante mediana e intervalo interquartil, conforme a assimetria das variáveis. O teste Kolmogorov–Smirnov foi realizado a fim de verificar a normalidade na distribuição das amostras para cada variável. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney (estudos com crianças ex-prematuras e indivíduos com obesidade). O teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações múltiplas foi utilizado para verificar as diferenças entre os grupos no estudo das crianças com asma. A fim de obter dados sobre uma possível relação entre comprimento de telômeros e a idade dos indivíduos e seu IMC, foram realizados testes de correlação não paramétricos de Spearman. Em todas as análises utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 5.0 e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22.0. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0,05$ .

## **5. ÉTICA**

Todos os procedimentos previstos foram realizados em consonância com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos (CIOMS 2002; [HTTP://www.cioms.ch/](http://www.cioms.ch/)), com cuidados especiais para a utilização da menor quantidade de material biológico possível.

Todos os indivíduos participantes deste estudo leram, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) respectivo para cada estudo, em duas vias de igual teor (anexado ao final da dissertação). Foi resguardado o sigilo em torno da identidade de cada indivíduo participante. Esse trabalho utilizou amostras de três projetos de pesquisa devidamente encaminhados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa. O projeto com crianças nascidas prematuramente (CAAE: 12323413.7.0000.5336) e o projeto com crianças asmáticas (CAAE: 0026.0.002.000-10), aprovados pelo CEP da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e o projeto com indivíduos portadores de obesidade, aprovado pelo CEP da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE: 26793114.0.0000.5347), sob o protocolo nº 640.817 (anexado ao final da dissertação) e da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 29576014.4.1001.5336).

## **6. TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS**

Todos os materiais contendo resíduos biológicos inertes e/ou tóxicos e resíduos químicos inertes e/ou tóxicos tiveram formas de descarte distinto e transitório no laboratório, sendo estes depois transferidos para seus respectivos destinos definitivos.

Os resíduos biológicos foram autoclavados, acondicionados em sacos brancos e congelados a -20°C. O material plástico descartável, como tubos de poliestireno, ponteiros e luvas que entrarem em contato com as células sanguíneas humanas foram primeiramente inativadas por contato com uma solução de 10% de hipoclorito diluído em água por 15 minutos e armazenados em recipiente adequado. Posteriormente, foram autoclavados e acondicionados em sacos brancos. O recolhimento dos resíduos biológicos e plásticos foi realizado pelo serviço específico da empresa Aborgama – POA, contratada pela UFRGS.

Os resíduos químicos foram separados adequadamente, identificados, armazenados transitoriamente em sala destinada para este fim e recolhidos pela Central de Gerenciamento e Tratamento de Rejeitos Químicos (CGTRQ) da UFRGS.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. RENDIMENTO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE gDNA

Não foi possível comparar diferentes métodos de extração nas mesmas amostras. Porém, partindo do mesmo número de células, o rendimento e o grau de pureza das amostras após a extração do gDNA diferenciou significativamente entre os três tipos celulares ( $P > 0,0001$ ), sendo que o maior rendimento e o maior grau de pureza foram obtidos na extração do gDNA a partir de PBMC (Tabela 2), utilizando o método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

Tabela 2. Rendimento e grau de pureza do DNA genômico dos três tipos celulares.

Variáveis	Leucócitos <sup>a</sup> (n = 304)	Mucosa oral <sup>b</sup> (n = 91)	PBMC <sup>c</sup> (n = 66)	<i>P</i>
Concentração (ng/uL), mediana (IQ)	232,9 (105,8-394,8)	112,2 (12,6-239,7)	532 (300,3-1.119,5)	<b>&lt; 0,0001</b>
Pureza ( $A_{260/280nm}$ ), mediana (IQ)	1,59 (1,51-1,68)	1,58 (1,15-1,67)	1,64 (1,6-1,7)	<b>&lt; 0,0001</b>

IQ = intervalo interquartil

<sup>a</sup> = Métodos de extração de DNA genômico com o kit Qiagen FlexiGene DNA; <sup>b</sup> = PureLink® Genomic DNA;

<sup>c</sup> = Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

Resultados expressos em mediana (intervalo interquartil)

Os resultados em negrito indicam diferença significativa entre os grupos (teste Kruskal-Wallis, nível de significância de 95%)

## 7.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR

A fim de padronizar a concentração ideal de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e otimizar a amplificação das sequências alvo, telômeros e 36B4, foram construídas matrizes – para 36B4 e telômeros – formada por diferentes concentrações dos iniciadores direto e reverso utilizando uma amostra escolhida de forma aleatória como referência durante todas as reações. A matriz foi estabelecida através de uma diluição seriada de cada iniciador, de forma que cinco diluições foram testadas, sendo que a maior concentração foi 1.125nM, e a menor 62,5nM. Além disso, para cada célula da matriz foi realizado um controle negativo, a fim de verificar a amplificação de produtos inespecíficos da reação, indicando a formação de dímeros de iniciadores. A escolha da concentração ideal de cada iniciador baseou-se na análise da emissão de maior fluorescência detectada no menor ciclo possível na ausência de amplificação do seu respectivo controle negativo.

Após análise dos resultados, escolhemos a concentração final dos iniciadores direto e reverso de 300nM e 500nM, respectivamente. Da mesma forma, foi realizada uma reação teste a partir da matriz formada por diferentes concentrações dos iniciadores para amplificação da sequência de telômeros. A análise dos resultados demonstrou que a concentração ideal dos iniciadores direto e reverso foi 300nM e 1.125nM, respectivamente (Figura 7).

	1	2	3	4	5		8	9	10	11	12
A	[+]						CN A1	CN A2	CN A3	CN A4	CN A5
B							CN B1	CN B2	CN B3	CN B4	CN B5
C	300nm 1.125nm	300nm 500nm					CN C1	CN C2	CN C3	CN C4	CN C5
D							CN D1	CN D2	CN D3	CN D4	CN D5
E							CN E1	CN E2	CN E3	CN E4	CN E5

Figura 7. Matriz de iniciadores direto e reverso para padronização da concentração ideal dos iniciadores. A célula da tabela hachurada em cinza representa a concentração escolhida dos iniciadores para o gene 36B4. A célula da tabela hachurada em branco representa a concentração escolhida dos iniciadores para a sequência telomérica. Os números superiores indicam a concentração dos iniciadores diretos, e os números inferiores indicam a concentração dos iniciadores reversos. As linhas contínuas representam a diluição seriada dos iniciadores diretos. As linhas pontilhadas representam a diluição seriada dos iniciadores reversos. [+] = Concentração máxima dos iniciadores direto e reverso; [-] = Concentração mínima dos iniciadores direto e reverso; CN = Controle negativo (respectivo a cada célula da tabela).

Como nosso desenho experimental, e posterior análise, inclui a comparação de resultados de diferentes reações, escolhemos utilizar o método de análise da curva padrão comparativa. Para a utilização desse método, é necessária a inclusão de uma curva padrão em cada reação, a partir da qual as amostras testes serão interpoladas. Assim, foi realizada a curva standard a partir da diluição seriada de um oligômero sintético (Figura 8). A partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão, determinamos a eficiência das reações. Reações com eficiência próxima a 100% indicam que o material genético duplica a cada ciclo da reação de qPCR. Como esperado, a eficiência de nossas reações ficou entre 85-100%, para todas as amplificações.

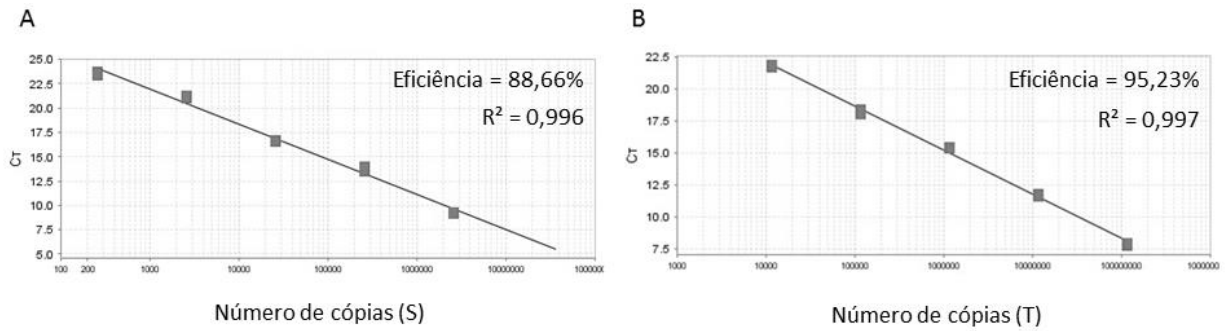


Figura 8. Eficiência e coeficiente de regressão linear após estabelecimento das curvas padrão para ambos os genes. A) 36B4. B) Telômeros.

SYBR Green é um agente intercalante com alta afinidade por DNA de fita dupla. Quando associado ao DNA, emite fluorescência. Entretanto, a fluorescência do SYBR Green não é específica para o produto amplificado. A fim de avaliarmos a especificidade do produto esperado, foi necessária a inclusão de uma curva de dissociação após a última etapa de ciclagem na reação de amplificação. Nessa etapa, programamos o termociclador para aumentar a temperatura a uma taxa constante de  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  entre  $60$  a  $95^{\circ}\text{C}$ . Como esperado para o controle endógeno 36B4, a primeira derivada da negativa da fluorescência em função do tempo correspondeu a um único pico, sugerindo a amplificação de um produto único (Figura 9A).

No caso da amplificação da sequencia telomérica, o pico resultante da curva de dissociação não é estreito pela forma, sugerindo a amplificação de produtos adicionais (Figura 9B).

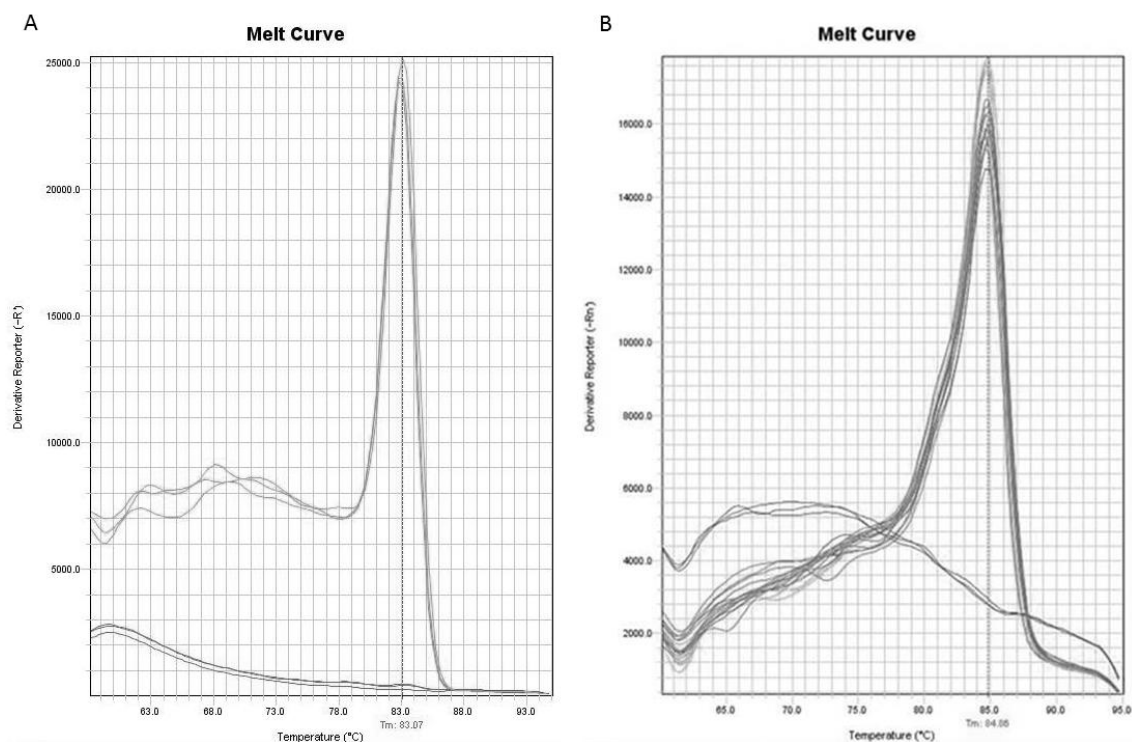


Figura 9. Análise das curvas de dissociação, após amplificação da amostra padrão e do controle negativo. O único pico demonstra a especificidade da reação, em ambas as reações. O controle negativo permaneceu inalterado. A) 36B4. B) Telômeros.

O resultado dos qPCR, tanto para a amplificação dos telômeros quanto para a amplificação do controle endógeno 36B4, foi confirmado em eletroforese em gel de agarose 3%, seguida por visualização sob iluminação UV. Nossos resultados demonstram a amplificação de um produto único do tamanho esperado de 76pb para o gene 36B4 após 30 ciclos. Como esperado, após 22 ciclos de qPCR a amplificação dos telômeros gerou vários produtos, formando um “padrão escada” até cerca de 500pb, uma vez que o produto mínimo possível de 76pb (formado pela soma do tamanho dos dois iniciadores) é esperado em número de cópias proporcional ao tamanho do telômero disponível para a hibridização do iniciador no primeiro ciclo da reação de qPCR (Figura 10).

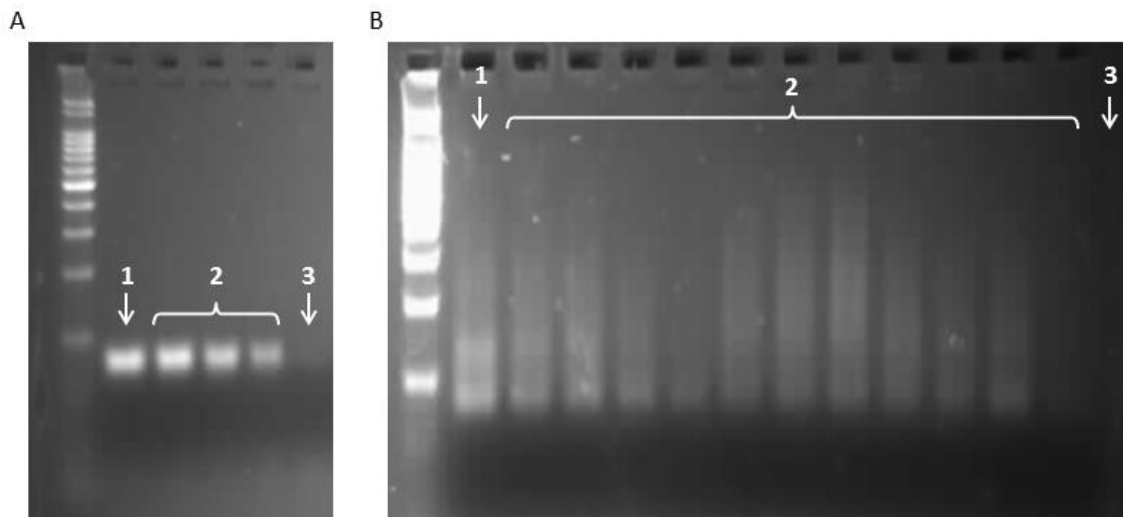


Figura 10. Análise por eletroforese em gel de agarose 3% após amplificação das sequências por PCR em tempo real. A) 36B4. B) Telômeros. 1 = Amostra de referência; 2 = Amostras investigadas; 3 = Controle negativo.

Finalmente realizamos a análise da razão T/S nas diferentes concentrações de DNA que constituíram os pontos da curva padrão. Assim confirmamos a estabilidade na detecção do comprimento de telômeros da técnica em diferentes concentrações (Figura 11).

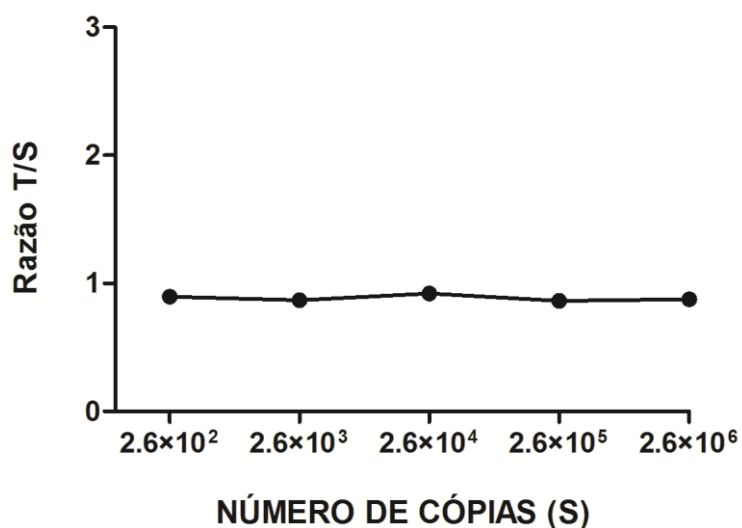


Figura 11. Estabilidade e reprodutibilidade da técnica de PCR em tempo real para amplificação da sequência telomérica, calculada pela determinação da razão T/S dos cinco pontos da curva padrão.



### 7.3. VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO T/S EM DIFERENTES POPULAÇÕES

#### 7.3.1. Crianças nascidas prematuramente

A prematuridade está frequentemente associada a situações de sofrimento fetal e neonatal, inflamação e estresse oxidativo, podendo-se supor que exista risco de encurtamento de telômeros (AUTEN; DAVIS, 2009; DAVIS; AUTEN, 2010). Nesse sentido, foram avaliadas 91 crianças, sendo 45 crianças saudáveis e 46 crianças ex-prematargas com idade de 7 a 12 anos. A Tabela 3 mostra os dados demográficos referentes à caracterização da população estudada. Os dois grupos foram comparáveis quanto a gênero, idade e tabagismo materno durante a gestação ( $P > 0.05$ ). Ainda, a idade gestacional variou de 26 a 36 semanas e o peso de nascimento de 0,808kg a 1.470kg.

Tabela 3. Caracterização demográfica da população de crianças sadias e ex-prematargas.

Variáveis	Controles (n = 45)	Ex-Prematuros (n = 46)	P
Gênero, n/total (%)	16/45 (35,5)	17/46 (37)	1,000
Idade (anos), mediana (IQ)	10,0 (9,0-11,0)	10,0 (8,8-11,0)	0,641
Peso ao nascimento (kg), mediana (IQ)	3,2 (3,1-3,4)	1,2 (1,0-1,3)	< <b>0,0001</b>
Idade gestacional (semanas), mediana (IQ)	39,0 (38,0-40,0)	30,0 (28,0-32,0)	< <b>0,0001</b>
Tabagismo materno na gestação, n (%)	7 (15,5)	7 (15,2)	1,000

IQ = intervalo interquartil

Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

Os resultados em negrito indicam diferença significativa entre os grupos (teste Mann-Whitney, nível de significância de 95%)

A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa na razão T/S de leucócitos entre o grupo composto por crianças ex-prematuras e seus controles ( $P = 0,5219$ ). A Figura 12 mostra a comparação da razão T/S nos dois grupos. O coeficiente de variação entre os experimentos foi de 6,26%, baseado na variação da razão T/S da amostra de referência.

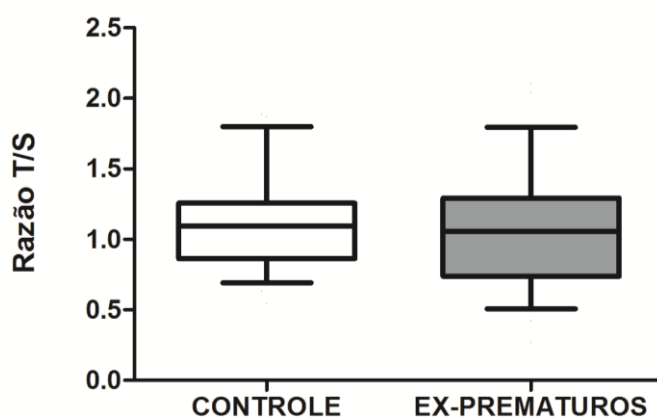


Figura 12. Avaliação do comprimento relativo de telômeros entre crianças ex-prematuras e o grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos (teste Mann-Whitney,  $P = 0,5219$ ).

### 7.3.2. Crianças portadoras de asma

Asma é classificada como uma doença crônica que geralmente se manifesta na infância. É caracterizada pela limitação do fluxo aéreo reversível ou a hiper-reatividade brônquica que (WILLIAMS et al., 2003). Devido à resposta terapêutica altamente variável, os tratamentos atuais, que são efetivos em pacientes portadores de asma leve a moderada são geralmente ineficazes em pacientes que sofrem de asma severa (DARVEAUX; BUSSE, 2015).

Dados recentes de três trabalhos evidenciam sinais de envelhecimento precoce, através do encurtamento acelerado de telômeros, em indivíduos adultos portadores de doença

obstrutiva pulmonar crônica (KYOHO et al., 2013) e asma (ALBRECHT et al., 2014; BELSKY et al., 2014). Entretanto, não há dados na literatura que demonstrem encurtamento de telômeros em crianças com asma.

Assim, foram avaliadas 213 crianças com idade de 8 a 14 anos. As crianças foram examinadas por clínicos pneumologistas pediatras e divididas em três grupos, de acordo ao resultado do questionário anamnésico e dos exames clínicos e físicos. A Tabela 4 mostra os dados referentes à caracterização da população estudada.

Tabela 4. Caracterização demográfica da população de crianças saudáveis e crianças com asma leve ou severa.

Variáveis	Controles (n = 73)	Asma leve (n = 123)	Asma severa (n = 17)	P
Gênero (masculino), n/total (%)	33/73 (45,2)	65/123 (52,8)	8/17 (47,6)	0,1017
Idade (anos), mediana (IQ)	11,6 (10,6-11,9)	11,3 (10,6-11,8)	9,0 (7,0-11,5)	0,2696
IMC, mediana (IQ)	18,9 (17,0-21,5)	19,0 (17,3-22,6)	19,8 (16,8-26,0)	0,8752

IQ = intervalo interquartil; IMC = índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>)

Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

Os resultados em negrito indicam diferença significativa entre os grupos (teste Kruskal-Wallis, nível de significância de 95%)

A análise dos resultados demonstrou que houve diferença significativa na razão T/S de leucócitos entre os grupos ( $P = 0,0426$ ). Nossos resultados evidenciam uma diferença significativa entre o grupo composto por crianças portadoras de asma severa, quando comparadas ao grupo controle e ao grupo composto por crianças portadoras de asma leve ( $P < 0,05$ ). A Figura 13 mostra a comparação da razão T/S nos três grupos. O coeficiente de variação entre os experimentos foi de 18,8%, baseado na variação da razão T/S da amostra de referência.

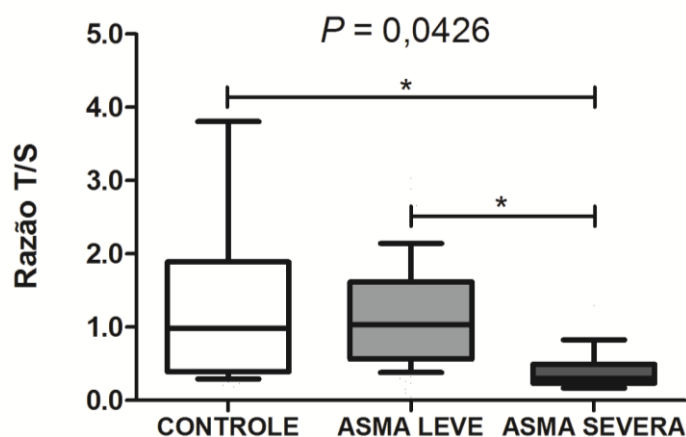


Figura 13. Avaliação do comprimento relativo de telômeros entre crianças portadoras de asma leve, asma severa e o grupo controle. Houve diferença significativa ( $P = 0,0426$ ) entre os três grupos analisados. \* = Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o grupo asma severa em relação ao grupo controle ou o grupo asma leve.

### 7.3.3. Indivíduos adultos portadores de obesidade

A obesidade é uma desordem relacionada diretamente com a porcentagem de gordura corporal total. Além de contribuir para o surgimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade acelera os processos celulares do envelhecimento, reduzindo a expectativa de vida (AHIMA, 2009). É frequentemente tratada como uma doença crônica também associada a um estado de estresse oxidativo elevado, induzindo um quadro sistêmico de inflamação associado a uma taxa acelerada de encurtamento de telômeros (SOHET et al., 2009; VALDES et al., 2005).

Foram avaliados 66 indivíduos adultos, sendo 45 saudáveis eutróficos sem comorbidades e 39 indivíduos portadores de obesidade severa ou mórbida ( $IMC \geq 35,0$ ). A Tabela 5 mostra os dados referentes à caracterização da população estudada. O grupo composto por adultos com obesidade apresentou significativa ocorrência de diferentes

comorbidades, sendo que a mais prevalente foi dislipidemia – em 61,5% dos pacientes. Além disso, o IMC variou de 33,71 a 74,19kg/m<sup>2</sup>, sendo que 87,18% desses indivíduos possuíam obesidade mórbida (IMC  $\geq$  40,0). Não houve diferença entre os grupos quanto à prática de atividade física.

Tabela 5. Caracterização demográfica da população de indivíduos eutróficos saudáveis e com obesidade.

Variáveis	Controles (n = 27)	Obesos (n = 39)	P
Gênero (masculino), n/total (%)	11/27 (40,7)	9/39 (23,1)	0,1742
Idade (anos), mediana (IQ)	28,0 (26,0-33,0)	36,0 (32,7-41,2)	<b>0,0006</b>
IMC, mediana (IQ)	22,1 (20,7-23,2)	45,0 (41,4-50,2)	<b>&lt; 0,0001</b>
Atividade física, n/total (%)	2/27 (7,4)	0/39 (0)	0,1636
Comorbidades, n/total (%)			
Síndrome metabólica	0/27 (0)	21/39 (53,8)	<b>&lt; 0,0001</b>
Diabetes mellitus tipo 2	0/27 (0)	11/39 (28,2)	<b>0,0019</b>
Hipertensão arterial sistêmica	0/27 (0)	21/39 (53,8)	<b>&lt; 0,0001</b>
Dislipidemia	0/27 (0)	24/39 (61,5)	<b>&lt; 0,0001</b>
Esteatose hepática	0/27 (0)	19/39 (48,7)	<b>&lt; 0,0001</b>

IQ = intervalo interquartil

Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

Os resultados em negrito indicam diferença significativa entre os grupos (nível de significância de 95%)

A análise dos resultados demonstrou encurtamento significativo dos telômeros (razão T/S) em PBMC nos indivíduos adultos com obesidade e seus controles ( $P = 0,0006$ ). Esse efeito permaneceu após ajuste para a idade, considerada uma variável confundidora ( $P = 0,026$ ). A Figura 14 detalha a comparação da razão T/S nos dois grupos, com ajuste para idade. O coeficiente de variação entre os experimentos foi de 3,78%, baseado na variação da razão T/S da amostra de referência.

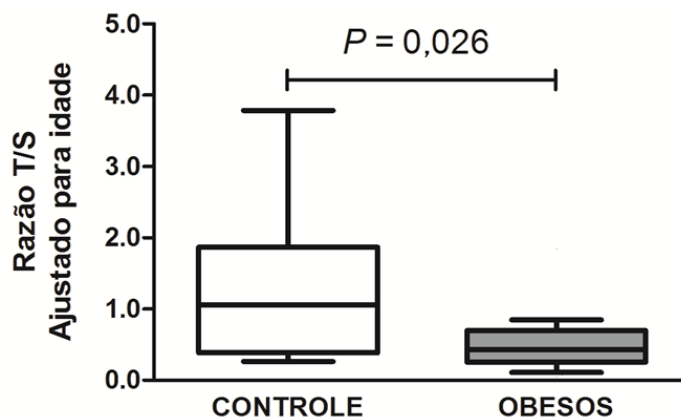


Figura 14. Avaliação do comprimento relativo de telômeros entre adultos portadores de obesidade severa e o grupo controle. Houve diferença significativa entre os grupos (teste Mann-Whitney).

Uma vez que os telômeros são considerados marcadores de idade biológica, foi realizado um teste de correlação entre o comprimento de telômeros e a idade dos indivíduos participantes. Os resultados demonstram uma associação inversa significativa entre comprimento de telômeros e idade nos indivíduos portadores de obesidade ( $r = -0,4108$ ,  $P = 0,0116$ , nível de significância de 95%) (Figura 15A). Também foi observada associação inversa significativa entre o IMC e o encurtamento dos telômeros nos pacientes com obesidade e indivíduos eutróficos ( $r = -0,4174$ ,  $P = 0,0005$ ) (Figura 15B).

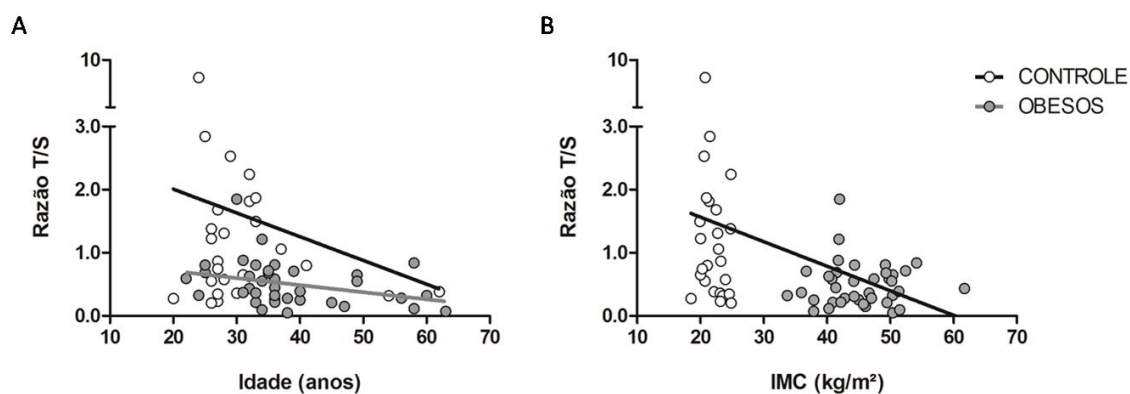


Figura 15. Análise de correlação entre a razão T/S e duas variáveis diferentes. A) Idade. Houve correlação inversa entre a idade dos indivíduos obesos e a razão T/S ( $r = -0,4108$ ,  $P = 0,0116$ ). Não houve diferença significativa em indivíduos saudáveis. B) IMC. Houve correlação inversa entre o IMC dos participantes do estudo de obesidade severa e a razão T/S ( $r = -0,4174$ ,  $P = 0,0005$ ).

### **PARTE III**



## 8. DISCUSSÃO

Evidências experimentais sugerem que o encurtamento dos telômeros, o surgimento de DDR, e senescência celular resultam em um fenótipo de envelhecimento. Em humanos, a detecção do comprimento relativo de telômeros é extensivamente relacionada ao envelhecimento e a patologias que aceleram esse fenótipo. Uma hipótese a cerca do envelhecimento é de que ocorra um encurtamento abrupto logo no início das doenças, sugerindo que o comprimento de telômeros pode ser um importante marcador biológico do desenvolvimento das patologias (OESEBURG et al., 2010).

O esgotamento das células progenitoras e o acúmulo de células senescentes pode ser um fator decisivo na perda da homeostase tecidual, acarretando no declínio da função celular, aumentando a progressão de doenças degenerativas, caracterizando o processo de envelhecimento (CUI; KONG; ZHANG, 2012). O encurtamento de telômeros tem sido associado com diversas doenças relacionadas à idade, incluindo câncer (CHEN et al., 2015), hipertensão associada à inflamação crônica (AULINAS et al., 2015), doenças cardiovasculares (HUNT; KARK; AVIV, 2015), entre outras. Doenças neurodegenerativas como Parkinson (MAEDA et al., 2012) e Alzheimer (GUAN et al., 2013) não apresentam aceleração do encurtamento de telômeros, mas estão associados à redução do número de telômeros longos.

O dano oxidativo ao DNA constitui o principal dano à DNA em células humanas. Uma das formas de dano ao DNA induzido por estresse oxidativo é a oxidação das bases de Guanina do DNA gerando 8-oxoguanina (8-oxoG) (AN et al., 2015). A lesão provocada por 8-oxoG induz mutações de troca de bases entre guanina e citosina por timina e adenina, e quando não reparada, há a indução de quebras de DNA de fita simples e duplas, acarretando em altos níveis de instabilidade genômica (COLUZZI et al., 2014).

Durante o estresse oxidativo, as trocas de base provocadas pela presença de 8-oxoG nos telômeros é maior, visto que a sequência telomérica é rica em guanina. Não obstante, o reparo ao dano no DNA telomérico é limitado quando comparado a outras regiões do genoma (RHEE et al., 2011). Mutações 8-oxoG inibem a atividade da telomerase e dificultam a interação do DNA telomérico com as proteínas do complexo *Shelterin*, contribuindo para a disfunção dos telômeros (BAILEY; MURNANE, 2006), o desenvolvimento de eventos genotóxicos e o surgimento de anomalias nucleares (como pontes nucleoplasmáticas) resultantes da instabilidade cromossomal (COLUZZI et al., 2014).

A detecção do comprimento de telômeros em diferentes células não é um processo tecnicamente simples, sendo necessária a padronização de uma técnica de alta reprodutibilidade, quando o objetivo do estudo é sua utilização em estudos epidemiológicos. A padronização de uma técnica de alta eficiência capaz de mensurar a sequência telomérica é o maior obstáculo para a inserção da avaliação de telômeros em estudos clínicos (BOJESEN, 2013). Dessa forma, esse estudo teve como principal objetivo estabelecer uma ferramenta rápida e eficiente de detecção de telômeros, capaz de permitir o desenvolvimento de diversos estudos em diferentes coortes, possibilitando determinar o estado de saúde dos indivíduos em relação à aceleração do envelhecimento.

Ainda hoje, a análise de quantificação do comprimento de telômeros por *Southern Blot* (TRF) é considerado como padrão ouro. Entretanto, muitos estudos demonstram uma significativa correlação positiva entre a razão T/S mensurada pela técnica de PCR e a técnica de quantificação por restrição de fragmentos *Southern Blot* ( $r^2 \geq 0,7$ ) (CAWTHON, 2002; ELBERS et al., 2014), demonstrando a confiabilidade e eficiência da avaliação do comprimento de telômeros através do método de quantificação por qPCR. Outra vantagem em favor da utilização de qPCR é a alta sensibilidade a qual permite o desenvolvimento de

estudos em larga escala, com o mínimo de material biológico necessário (30-150ng), com baixo coeficiente de variação entre as reações (MONTPETIT et al., 2014).

Embora haja uma correlação positiva entre a técnica de qPCR e a quantificação TRF, é possível observar valores discrepantes quanto ao comprimento de telômeros em determinados estudos. A possível explicação para esse fato é a metodologia de quantificação entre as duas técnicas. Enquanto a quantificação TRF detecta as regiões telomérica e subtelomérica (até as enzimas de restrição encontrarem um local para a clivagem), a técnica de qPCR detecta exclusivamente a região telomérica – composta pela sequência de nucleotídeos TTAGGG (em mamíferos). Dessa forma, a detecção de telômeros pela técnica de qPCR proporciona resultados mais precisos em estudos que apresentem grande variabilidade de material biológico (ELBERS et al., 2014).

Além disso, os métodos de detecção relativa de telômeros, incluindo a mensuração por TRF e metodologias como FISH, normalizam os resultados utilizando regiões do DNA que apresentam elevado número de cópias, seja DNA centromérico (CANELA et al., 2007) ou repetições Alu (WANG, F. et al., 2013). Assim a variação do número de cópias dessas sequências entre os indivíduos pode levar à imprecisão nos resultados. Ao normalizar a quantidade de repetições teloméricas pela quantidade de cópias de um gene de cópia única, como 36B4,  $\beta$ -globina ou albumina, o método de qPCR diminui essa limitação (CAWTHON, 2002).

A literatura tem demonstrado que diferentes métodos de extração de DNA (DENHAM; MARQUES; CHARCHAR, 2014), bem como estocagem e a qualidade do DNA têm um impacto significativo na determinação do comprimento de telômeros pela técnica de PCR (CUNNINGHAM et al., 2013). Nossos resultados demonstram alta qualidade do material genético, baseado na pureza observada após a extração do gDNA de leucócitos e PBMC. A alta variação da pureza do gDNA – a maioria das amostras apresentou pureza

abaixo de 1,6, indicando contaminação proteica – extraído de células epiteliais da mucosa oral pode ser uma explicação para a dificuldade na detecção do comprimento de telômeros desse tipo celular. Além disso, um alto nível de contaminantes químicos como detergentes iônicos, ou o próprio dano à região telomérica durante o processo de extração pode ter resultado na ineficiência da técnica.

Além disso, estudos demonstram que, embora exista uma correlação, o comprimento de telômeros de diferentes populações celulares do mesmo indivíduo pode variar, mesmo utilizando a mesma técnica para a detecção (GADALLA et al., 2010). Esse estudo permitiu a avaliação do comprimento de telômeros a partir de leucócitos e de PBMC. Os resultados obtidos nos permitiram determinar o tipo de material biológico e seu método de extração a fim de obter alta eficiência da técnica, tornando-a reprodutível.

Com base nos resultados obtidos nos três estudos utilizados para validar a padronização da qPCR, pode-se observar uma maior variabilidade no rTL dos indivíduos que constituíram os grupos controle, quando comparados aos seus respectivos casos. Esse padrão possivelmente deve-se ao fato de que os indivíduos considerados como controles (saudáveis) constituem um grupo heterogêneo, respondendo a diversos fatores – como eventos de estresse psicossocial (ZAHKAN et al., 2015), estresse oxidativo (CHAICHOMPOO et al., 2015), inflamação crônica (GLEI et al., 2014), ou outros fatores – que influenciam de forma variável o comprimento de seus telômeros e que não foram documentados no momento da seleção. A baixa variabilidade do rTL dos indivíduos que compuseram os grupos caso pode estar relacionado à prevalência de um conjunto de fatores específicos à manifestação de cada doença (peso ao nascimento, função pulmonar, IMC, comorbidades), de forma a estabelecer um grupo mais homogêneo, restringindo os valores do rTL a um menor intervalo.

A biologia dos tecidos utilizados nesse estudo deve ser considerada na análise dos resultados, devido à sua variabilidade. Leucócitos são constituídos por diferentes linhagens

celulares (células mononucleares e polimorfonucleares), e as suas proporções no sangue são altamente variáveis, mesmo em indivíduos saudáveis. As células polimorfonucleares consistem principalmente em neutrófilos, os quais possuem uma proporção que varia de 40-70% dos leucócitos totais, tendo uma vida útil muito curta – cerca de 1-3 dias (DLOUHA et al., 2014). Já linfócitos, que compõem cerca de 70- 90% das células mononucleares, possuem um tempo de vida de poucas semanas (ROTH et al., 2003).

Dessa forma, a variabilidade do comprimento de telômeros nos diferentes estudos com crianças (ex-prematuras e asmáticas), mensurado a partir de leucócitos totais, pode ser explicada pelos distintos tempos de vida dos diferentes tipos celulares que constituem a população de leucócitos.

Outra limitação que pode ser observada nesse estudo é decorrente da utilização de diferentes métodos de extração nos três tipos de células utilizados, impedindo a comparação da qualidade tecido-específica da metodologia empregada na extração do gDNA através dos estudos aqui detalhados.

Embora o comprimento de telômeros possa refletir, pelo menos em parte, efeitos relacionados a exposições anteriores de ordem biológica e emocional, os resultados desse estudo, obtidos com a população de crianças ex-prematuras, não qualificam o nascimento prematuro como um possível marcador para um mecanismo que associa condições neonatais a processos que acelerem o envelhecimento da população em geral. Um estudo anterior em uma população de adultos ex-prematuros observou que não houve relação entre o comprimento de telômeros e a idade gestacional ou peso ao nascimento (KAJANTIE et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Os resultados desse estudo podem sugerir que o encurtamento dos telômeros, se presente no início da vida, seria revertido durante a infância através de mecanismos que alonguem a sequência telomérica. Além disso, o efeito da prematuridade sobre telômeros

parece estar restrito a prematuros que apresentem ruptura prematura de membranas amnióticas no nascimento, em comparação a nascimentos prematuros com membranas intactas (MENON et al., 2012).

Encontramos telômeros encurtados em crianças portadoras de asma em leucócitos de sangue periférico. Esse é o primeiro trabalho na literatura que relata a presença de telômeros mais curtos em crianças que apresentam asma severa. Esse resultado sugere que o comprimento de telômeros pode ser proposto como um marcador geral associado a diferentes comorbidades, inclusive a asma. Mais ainda, nossos resultados se correlacionam com dados recentes obtidos em adultos com asma crônica (KYOHO et al., 2013). Assim um mecanismo molecular que reflete no encurtamento acelerado de telômeros, poderia ser desencadeado pela ocorrência de asma severa iniciada já na infância e que poderia contribuir para o fenótipo de envelhecimento precoce presente em adultos.

Além disso, estudos indicam que uma associação entre inflamação eosinofílica sistêmica parece estar envolvida durante a persistência da asma. Especificamente, o aumento dos níveis de eosinófilos circulantes pode representar cerca de um terço da associação entre asma crônica e comprimento dos telômeros (BELSKY et al., 2014).

Não obstante, a patogênese de muitas doenças relacionadas à idade envolve eosinófilos (SIMON; SIMON, 2007). Assim, se a inflamação eosinofílica contribui para o encurtamento de telômeros durante as fases iniciais do desenvolvimento imunológico inato, telômeros curtos também poderiam ser considerados uma característica de distúrbios eosinofílicos já presentes na infância (BELSKY et al., 2014).

A análise dos dados de adultos portadores de obesidade severa indica uma significativa associação com o comprimento reduzido de telômeros. Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser corroborados com resultados de outros estudos recentes, sugerindo que o comprimento de telômeros pode ser um fator de risco para um aumento da adiposidade

(NJAJOU et al., 2012). Em outro estudo, há evidências de que o impacto causado pelo encurtamento acelerado dos telômeros, devido à obesidade, pode começar ainda na infância. A avaliação de 793 crianças entre 2 e 17 anos demonstrou uma forte associação entre telômeros curtos e a ocorrência de obesidade (BUXTON et al., 2011).

Os mecanismos biológicos que elucidam a relação entre o encurtamento acelerado de telômeros e obesidade têm sido alvo de vários estudos. Em roedores observou-se que o encurtamento dos telômeros pode contribuir para a disfunção metabólica através do impacto sobre a biogênese mitocondrial (SAHIN et al., 2011). Outro estudo recente acompanhou, por 12 meses, 93 indivíduos portadores de obesidade severa, submetidos à cirurgia bariátrica. Os resultados demonstraram que há redução no comprimento de telômeros, quando comparados ao grupo formado por indivíduos eutróficos, mas não foi observado efeito da cirurgia sobre a taxa do encurtamento de telômeros (FORMICHI et al., 2014).

Por outro lado, há diversos estudos destacando fatores de estilo de vida que estão correlacionados a manutenção da sequência telomérica. Sendo assim, há evidências de que altos níveis de escolaridade (STEPTOE et al., 2011), controle do pessimismo (O'DONOVAN et al., 2009) e prática de atividade física (CHERKAS et al., 2008) estão relacionados à telômeros longos. Também há evidências de que restrição calórica, como a ingestão de vitamina D (RICHARDS et al., 2007), folato (PAUL et al., 2009), complexos vitamínicos formados principalmente por vitaminas C e E (PAUL, 2011) mantêm a sequência telomérica longa.

Também há dados na literatura que demonstram evidências de que intervenções possam reverter o encurtamento acelerado de telômeros, baseado em programas que provoquem a mudança do estilo de vida dos indivíduos. Em um estudo acompanhando, por três meses, pacientes com câncer de próstata, a mudança de estilo de vida, incluindo dieta equilibrada, acompanhamento por terapia de grupo, atividade física moderada e controle dos

níveis de estresse, contribuiu para o alongamento da sequência telomérica, diminuindo a aceleração do processo de envelhecimento (ORNISH et al., 2008).

Assim, o encurtamento de telômeros surge como um possível biomarcador com o potencial de elucidar novos mecanismos moleculares subjacentes no desenvolvimento de diversas doenças. Seu potencial uso também sugere que essa informação possa ser utilizada para identificar indivíduos com maior risco e planejar intervenções benéficas a fim de evitar o surgimento da doença em questão.

## **9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Dessa forma, os resultados desse trabalho permitem concluir que:

- Não conseguimos estabelecer comparações entre os diferentes métodos de extração utilizados. Entretanto, escolhemos a extração de gDNA a partir do método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico pelo alto rendimento, pureza e custo reduzido;
- Foi possível padronizar e estabelecer uma técnica para detecção do comprimento de telômeros baseada em qPCR com baixo coeficiente de variação e alta reprodutibilidade da técnica;
- Foi possível detectar o comprimento de telômeros em leucócitos e células mononucleares de sangue periférico;
- Foi possível validar nossa técnica de qPCR para a determinação de comprimento de telômeros em crianças ex-prematargas, crianças asmáticas, e indivíduos adultos com obesidade;



- A partir dos resultados obtidos nesse estudo, junto com os dados referentes a variáveis clínicas e epidemiológicas dos indivíduos incluídos nesse trabalho, iniciaremos a realização de análises multivariadas associadas ao comprimento dos telômeros.

## REFERÊNCIAS

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 4ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2012.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística. Princípios e aplicações**. Porto Alegre. ArtMed, 2007.

BONATO, MCM. **Genética: Máquinas Replicadoras**. Paraíba. 2004. p. 37-40

WHO (World Health Organization). Obesity and overweight, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>

MULLER, H. The remaking of chromosomes. **Collecting Net**, 8:182–95.1938.

ABDALLAH, P. et al. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 988-93, Aug 2009.

AHIMA, R. S. Connecting obesity, aging and diabetes. **Nat Med**, v. 15, n. 9, p. 996-7, Sep 2009.

ALBRECHT, E. et al. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. **Eur Respir J**, v. 43, n. 4, p. 983-92, Apr 2014.

AN, N. et al. Nanopore Detection of 8-Oxoguanine in the Human Telomere Repeat Sequence. **ACS Nano**, Mar 17 2015.

ARMANIOS, M.; BLACKBURN, E. H. The telomere syndromes. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 10, p. 693-704, Oct 2012.

AUBERT, G.; HILLS, M.; LANSDORP, P. M. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. **Mutat Res**, v. 730, n. 1-2, p. 59-67, Feb 1 2012.

AULINAS, A. et al. Dyslipidemia and Chronic Inflammation Markers Are Correlated with Telomere Length Shortening in Cushing's Syndrome. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120185, 2015.

AUTEN, R. L.; DAVIS, J. M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. **Pediatr Res**, v. 66, n. 2, p. 121-7, Aug 2009.

AUTEXIER, C.; LUE, N. F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 493-517, 2006.

BAERLOCHER, G. M.; LANSDORP, P. M. Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. **Cytometry A**, v. 55, n. 1, p. 1-6, Sep 2003.

BAERLOCHER, G. M. et al. Telomere shortening in leukocyte subpopulations from baboons. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 2, p. 289-96, Feb 2003.

BAERLOCHER, G. M. et al. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2365-76, 2006.

BAILEY, S. M.; MURNANE, J. P. Telomeres, chromosome instability and cancer. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 8, p. 2408-17, 2006.

BAIRD, D. M. et al. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. **Nat Genet**, v. 33, n. 2, p. 203-7, Feb 2003.

BELSKY, D. W. et al. Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, n. 4, p. 384-91, Aug 15 2014.

BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 661-73, Sep 21 2001.

BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **J Mol Biol**, v. 120, n. 1, p. 33-53, Mar 25 1978.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 611-22, Aug 2005.

BOJESSEN, S. E. Telomeres and human health. **J Intern Med**, v. 274, n. 5, p. 399-413, Nov 2013.

BOULAY, J. L. et al. Gene dosage by quantitative real-time PCR. **Biotechniques**, v. 27, n. 2, p. 228-30, 232, Aug 1999.

BURNS, D. M.; RICHTER, J. D. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. **Genes Dev**, v. 22, n. 24, p. 3449-60, Dec 15 2008.

BUTT, H. Z. et al. Telomere length dynamics in vascular disease: a review. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 40, n. 1, p. 17-26, Jul 2010.

BUXTON, J. L. et al. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 5, p. 1500-5, May 2011.

CANELA, A. et al. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 13, p. 5300-5, Mar 27 2007.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e47, May 15 2002.

CHAE, D. H. et al. Discrimination, racial bias, and telomere length in African-American men. **Am J Prev Med**, v. 46, n. 2, p. 103-11, Feb 2014.

CHAI, W. et al. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. **Mol Cell**, v. 21, n. 3, p. 427-35, Feb 3 2006.

CHAICHOMPOO, P. et al. Accelerated telomere shortening in beta-thalassemia/HbE patients. **Blood Cells Mol Dis**, Jan 17 2015.

CHEN, Y. et al. Leukocyte telomere length: a novel biomarker to predict the prognosis of glioma patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, Feb 22 2015.

CHERKAS, L. F. et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. **Arch Intern Med**, v. 168, n. 2, p. 154-8, Jan 28 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9, Apr 1987.

CIMINO-REALE, G. et al. The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 7, p. E35, Apr 1 2001.

COLUZZI, E. et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110963, 2014.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 646354, 2012.

CUNNINGHAM, J. M. et al. Telomere length varies by DNA extraction method: implications for epidemiologic research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 11, p. 2047-54, Nov 2013.

DARVEAUX, J.; BUSSE, W. W. Biologics in asthma-the next step toward personalized treatment. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 3, n. 2, p. 152-60, Mar-Apr 2015.

DAVIS, J. M.; AUTEN, R. L. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 15, n. 4, p. 191-5, Aug 2010.

DENHAM, J.; MARQUES, F. Z.; CHARCHAR, F. J. Leukocyte telomere length variation due to DNA extraction method. **BMC Res Notes**, v. 7, p. 877, 2014.

DERRADJI, H. et al. Comparison of different protocols for telomere length estimation by combination of quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) and flow cytometry in human cancer cell lines. **Anticancer Res**, v. 25, n. 2A, p. 1039-50, Mar-Apr 2005.

DING, C.; CANTOR, C. R. Quantitative analysis of nucleic acids--the last few years of progress. **J Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 1-10, Jan 31 2004.

DLOUHA, D. et al. Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues. **Physiol Res**, v. 63 Suppl 3, p. S343-50, 2014.

DRURY, S. S. et al. Telomere length and early severe social deprivation: linking early adversity and cellular aging. **Mol Psychiatry**, v. 17, n. 7, p. 719-27, Jul 2012.

EGAN, E. D.; COLLINS, K. Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. **RNA**, v. 18, n. 10, p. 1747-59, Oct 2012.

ELBERS, C. C. et al. Comparison between southern blots and qPCR analysis of leukocyte telomere length in the health ABC study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. 5, p. 527-31, May 2014.

ENTRINGER, S. et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 33, p. E513-8, Aug 16 2011.

ENTRINGER, S. et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. **Am J Obstet Gynecol**, v. 208, n. 2, p. 134 e1-7, Feb 2013.

FORMICHI, C. et al. Weight loss associated with bariatric surgery does not restore short telomere length of severe obese patients after 1 year. **Obes Surg**, v. 24, n. 12, p. 2089-93, Dec 2014.

FORSYTH, N. R.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. **Differentiation**, v. 69, n. 4-5, p. 188-97, Jan 2002.

FOULADI, B. et al. The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line. **Neoplasia**, v. 2, n. 6, p. 540-54, Nov-Dec 2000.

GADALLA, S. M. et al. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 11, p. 867-74, Nov 2010.

GALLARDO, F. et al. Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. **Mol Cell**, v. 44, n. 5, p. 819-27, Dec 9 2011.

GLEI, D. A. et al. Shorter Ends, Faster End? Leukocyte Telomere Length and Mortality Among Older Taiwanese. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, Oct 17 2014.

GOMEZ, D. E. et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). **Int J Oncol**, v. 41, n. 5, p. 1561-9, Nov 2012.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 887-98, Dec 24 1987.

GUAN, J. Z. et al. Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leukocytes in women with Alzheimer's disease. **Aging Clin Exp Res**, v. 25, n. 1, p. 17-23, Apr 2013.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, v. 25, p. 585-621, Dec 1961.

HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413-25, Dec 2006.

HUKEZALIE, K. R.; WONG, J. M. Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. **FEBS J**, v. 280, n. 14, p. 3194-204, Jul 2013.

HUNT, S. C.; KARK, J. D.; AVIV, A. Association between shortened leukocyte telomere length and cardio-metabolic outcomes. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 8, n. 1, p. 4-7, Feb 2015.

KAJANTIE, E. et al. No association between body size at birth and leucocyte telomere length in adult life--evidence from three cohort studies. **Int J Epidemiol**, v. 41, n. 5, p. 1400-8, Oct 2012.

KAZDA, A. et al. Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. **Genes Dev**, v. 26, n. 15, p. 1703-13, Aug 1 2012.

KIM, S. et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 3, p. 816-20, Mar 2009.

KIMURA, M. et al. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. **Nat Protoc**, v. 5, n. 9, p. 1596-607, Sep 2010.

KONG, C. M.; LEE, X. W.; WANG, X. Telomere shortening in human diseases. **FEBS J**, v. 280, n. 14, p. 3180-93, Jul 2013.

KYOH, S. et al. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 2, p. 480-2 e2, Aug 2013.

LAUZON, W. et al. Flow cytometric measurement of telomere length. **Cytometry**, v. 42, n. 3, p. 159-64, Jun 15 2000.

LEUNG, C. W. et al. Soda and cell aging: associations between sugar-sweetened beverage consumption and leukocyte telomere length in healthy adults from the National Health and Nutrition Examination Surveys. **Am J Public Health**, v. 104, n. 12, p. 2425-31, Dec 2014.

LIN, K. W.; YAN, J. The telomere length dynamic and methods of its assessment. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 977-89, Oct-Dec 2005.

LONDONO-VALLEJO, J. A. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. **Cancer Lett**, v. 212, n. 2, p. 135-44, Aug 30 2004.

LY, H. et al. Identification and functional characterization of 2 variant alleles of the telomerase RNA template gene (TERC) in a patient with dyskeratosis congenita. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1246-52, Aug 15 2005.

MAEDA, T. et al. Aging-associated alteration of telomere length and subtelomeric status in female patients with Parkinson's disease. **J Neurogenet**, v. 26, n. 2, p. 245-51, Jun 2012.

MATERA, A. G.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 209-20, Mar 2007.

MCCLINTOCK, B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 25, n. 8, p. 405-16, Aug 1939.

MEEKER, A. K. et al. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. **Am J Pathol**, v. 160, n. 4, p. 1259-68, Apr 2002.

MENON, R. et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. **Am J Pathol**, v. 184, n. 6, p. 1740-51, Jun 2014.

MENON, R. et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31136, 2012.

MITCHELL, J. R.; WOOD, E.; COLLINS, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. **Nature**, v. 402, n. 6761, p. 551-5, Dec 2 1999.

MONAGHAN, P.; HAUSSMANN, M. F. Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? **Trends Ecol Evol**, v. 21, n. 1, p. 47-53, Jan 2006.

MONTPETIT, A. J. et al. Telomere length: a review of methods for measurement. **Nurs Res**, v. 63, n. 4, p. 289-99, Jul-Aug 2014.

NAKAGAWA, S.; GEMMELL, N. J.; BURKE, T. Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations. **Mol Ecol**, v. 13, n. 9, p. 2523-33, Sep 2004.

NANDAKUMAR, J.; CECH, T. R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 2, p. 69-82, Feb 2013.



NEEDHAM, B. L. et al. Socioeconomic status and cell aging in children. **Soc Sci Med**, v. 74, n. 12, p. 1948-51, Jun 2012.

NELSON, A. D.; SHIPPEN, D. E. Blunt-ended telomeres: an alternative ending to the replication and end protection stories. **Genes Dev**, v. 26, n. 15, p. 1648-52, Aug 1 2012.

NILSSON, P. M. Genetics: telomere length and the metabolic syndrome-a causal link? **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 12, p. 706-7, Dec 2014.

NJAJOU, O. T. et al. Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 9, p. 1176-9, Sep 2012.

O'CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biol Proced Online**, v. 13, p. 3, 2011.

O'DONOVAN, A. et al. Pessimism correlates with leukocyte telomere shortness and elevated interleukin-6 in post-menopausal women. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 4, p. 446-9, May 2009.

O'SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 171-81, Mar 2010.

OESEBURG, H. et al. Telomere biology in healthy aging and disease. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 2, p. 259-68, Jan 2010.

OLOVNIKOV, A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v. 201, n. 6, p. 1496-9, 1971.

ORNISH, D. et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 11, p. 1048-57, Nov 2008.

PAUL, L. Diet, nutrition and telomere length. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 10, p. 895-901, Oct 2011.

PAUL, L. et al. Telomere length in peripheral blood mononuclear cells is associated with folate status in men. **J Nutr**, v. 139, n. 7, p. 1273-8, Jul 2009.

PAVANELLO, S. et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. **Int J Cancer**, v. 129, n. 4, p. 983-92, Aug 15 2011.

PRESCOTT, J. et al. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. **Mutat Res**, v. 730, n. 1-2, p. 75-84, Feb 1 2012.

RHEE, D. B. et al. Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. **DNA Repair (Amst)**, v. 10, n. 1, p. 34-44, Jan 2 2011.

RICHARDS, J. B. et al. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 5, p. 1420-5, Nov 2007.

ROTH, A. et al. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 849-57, Aug 1 2003.

RUBTSOVA, M. P. et al. Telomere lengthening and other functions of telomerase. **Acta Naturae**, v. 4, n. 2, p. 44-61, Apr 2012.

RUFER, N. et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. **J Exp Med**, v. 190, n. 2, p. 157-67, Jul 19 1999.

RUFER, N. et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 8, p. 743-7, Aug 1998.

SAHIN, E. et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 359-65, Feb 17 2011.

SALDANHA, S. N.; ANDREWS, L. G.; TOLLEFSBOL, T. O. Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 3, p. 389-403, Feb 2003.

SALIHU, H. M. et al. Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 2, p. 205 e1-8, Feb 2015.

SALPEA, K. D.; HUMPHRIES, S. E. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. **Atherosclerosis**, v. 209, n. 1, p. 35-8, Mar 2010.

SANDERS, J. L. et al. Leukocyte telomere length is associated with noninvasively measured age-related disease: The Cardiovascular Health Study. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 67, n. 4, p. 409-16, Apr 2012.

SHALEV, I. et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 576-81, May 2013.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 1, p. 28-34, Jan 2011.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 72-6, Oct 2000.

\_\_\_\_\_. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 867-74, May 2005.

SIMON, D.; SIMON, H. U. Eosinophilic disorders. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 6, p. 1291-300; quiz 1301-2, Jun 2007.

SOHET, F. M. et al. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 11, p. 1391-400, Dec 1 2009.

STEPTOE, A. et al. Educational attainment but not measures of current socioeconomic circumstances are associated with leukocyte telomere length in healthy older men and women. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 7, p. 1292-8, Oct 2011.

STEWART, S. A. et al. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. **Nat Genet**, v. 33, n. 4, p. 492-6, Apr 2003.

STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. Telomeres: cancer to human aging. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 531-57, 2006.

SZOSTAK, J. W.; BLACKBURN, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. **Cell**, v. 29, n. 1, p. 245-55, May 1982.

TAKUBO, K. et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. **Exp Gerontol**, v. 37, n. 4, p. 523-31, Apr 2002.

VALDES, A. M. et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. **Lancet**, v. 366, n. 9486, p. 662-4, Aug 20-26 2005.

WANG, F. et al. Robust measurement of telomere length in single cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 21, p. E1906-12, May 21 2013.

WANG, J. et al. Characterization of a human telomerase reverse transcriptase sequence containing two antigenic epitopes with high affinity for human leucocyte antigen. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 48, n. Pt 2, p. 93-9, Oct 2007.

WATSON, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. **Nat New Biol**, v. 239, n. 94, p. 197-201, Oct 18 1972.

WELLINGER, R. J. In the end, what's the problem? **Mol Cell**, v. 53, n. 6, p. 855-6, Mar 20 2014.

WILLIAMS, S. G. et al. Key clinical activities for quality asthma care. Recommendations of the National Asthma Education and Prevention Program. **MMWR Recomm Rep**, v. 52, n. RR-6, p. 1-8, Mar 28 2003.

ZAHRAN, S. et al. Stress and telomere shortening among central Indian conservation refugees. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 9, p. E928-36, Mar 3 2015.

ZHANG, X. et al. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. **Postgrad Med J**, v. 89, n. 1058, p. 722-8, Dec 2013.

ZHAO, Y. et al. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 3, p. e14, Feb 2008.

ZHDANOVA, N. S.; MININA IU, M.; RUBTSOV, N. B. [Mammalian telomere biology]. **Mol Biol (Mosk)**, v. 46, n. 4, p. 539-55, Jul-Aug 2012.

ZOU, Y. et al. Altered states of telomere deprotection and the two-stage mechanism of replicative aging. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 9, p. 2390-7, May 2009.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	16
Figura 2.....	17
Figura 3.....	21
Figura 4.....	23
Figura 5.....	27
Figura 6.....	34
Figura 7.....	52
Figura 8.....	53
Figura 9.....	54
Figura 10.....	55
Figura 11.....	55
Figura 12.....	57
Figura 13.....	59
Figura 14.....	61
Figura 15.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 .....	46
Tabela 2 .....	50
Tabela 3 .....	56
Tabela 4 .....	58
Tabela 5 .....	60

## ANEXO A (Questionário sobre qualidade de vida FACES III)

### Questionário FACES III

AVALIE AS ASSERTATIVAS ABAIXO, PREENCHENDO OS QUADRADOS CONFORME A ESCALA:

O NÚMERO INDICA O CONCEITO QUE NA SUA OPINIÃO MELHOR RESPONDE À PERGUNTA

1	2	3	4	5
Quase nunca	Raramente	Às vezes	Freqüentemente	Quase sempre

DESCREVA SUA FAMÍLIA ATUALMENTE:

<input type="checkbox"/>	1. Os membros da família pedem ajuda uns aos outros
<input type="checkbox"/>	2. Seguem-se as sugestões dos filhos na solução de problemas
<input type="checkbox"/>	3. Aprovamos os amigos que cada um tem
<input type="checkbox"/>	4. Os filhos expressam suas opiniões quanto a sua disciplina
<input type="checkbox"/>	5. Gostamos de fazer coisas apenas com a nossa família
<input type="checkbox"/>	6. Diferentes pessoas da família atuam nela como líderes
<input type="checkbox"/>	7. Os membros da família sentem-se mais próximos entre si que com pessoas estranhas 'a família
<input type="checkbox"/>	8. Em nossa família mudamos a forma de executar as tarefas domésticas?
<input type="checkbox"/>	9. Os membros da família gostam de passar o tempo livre juntos
<input type="checkbox"/>	10. Pais e filhos discutem juntos os castigos
<input type="checkbox"/>	11. Os membros da família se sentem muito próximos uns dos outros
<input type="checkbox"/>	12. Os filhos tomam as decisões em nossa família
<input type="checkbox"/>	13. Estamos todos presentes quando compartilhamos atividades em nossa família
<input type="checkbox"/>	14. As regras mudam em nossa família
<input type="checkbox"/>	15. Facilmente nos ocorrem coisas que podemos fazer juntos em família
<input type="checkbox"/>	16. Em nossa família fazemos rodízio das responsabilidades domésticas
<input type="checkbox"/>	17. Os membros da família consultam outras pessoas da família para tomarem suas decisões
<input type="checkbox"/>	18. É difícil identificar o(s) líder(es) na nossa família
<input type="checkbox"/>	19. A união familiar é muito importante
<input type="checkbox"/>	20. É difícil dizer quem faz cada tarefa doméstica em nossa casa

POSIÇÃO NA FAMÍLIA> MÃE ( ) PAI ( ) OUTRO ( ) \_\_\_\_\_

## ANEXO B (Carta de permissão para a realização das coletas no COM HSL PUCRS)

Porto Alegre, 18 de Novembro de 2013

Ao Comitê de Ética da UFRGS

Declaro que tenho conhecimento e autorizo a realização do projeto intitulado “Determinação do comprimento de telômeros em diferentes populações celulares de obesos mórbidos” proposto pelos pesquisadores Lucas Kich Grun, Dra. Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma e Dra. Florencia María Barbé-Tuana.

O referido projeto será realizado através de coletas feitas no ambulatório de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Hospital São Lucas da PUCRS (COM HSL PUCRS) sendo que as análises genéticas do material coletado serão feitas nos laboratórios do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Informo, outrossim, que estas ações só poderão ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS e da PUCRS.

Atenciosamente,



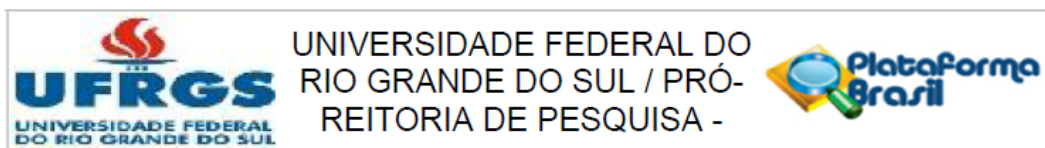
Dr. Cláudio Corá Mottin, MD PhD

Chefe do COM HSL PUCRS

Hospital São Lucas da PUCRS



## ANEXO C (Aprovação do Comitê de Ética da UFRGS)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Determinação do comprimento de telômeros em diferentes populações celulares de obesos mórbidos

**Pesquisador:** Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 26793114.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 640.817

**Data da Relatoria:** 20/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

A obesidade é uma desordem definida pelo índice de massa corporal (IMC), relacionada diretamente com a porcentagem de gordura corporal total. Além de

contribuir para o surgimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade acelera os processos celulares do envelhecimento, reduzindo a expectativa de vida. Este estudo, no contexto de uma dissertação de mestrado, avaliará o tamanho de telômeros em indivíduos obesos.

**Objetivo da Pesquisa:**

O presente projeto visa agregar aos estudos com indivíduos obesos dados sobre o encurtamento dos telômeros.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos e benefícios adequadamente apresentados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Possui mérito.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE apresentado adequadamente

Concordância do ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital São Lucas da PUCRS presente.

<b>Endereço:</b> Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
<b>Bairro:</b> Farroupilha <b>CEP:</b> 90.040-060
<b>UF:</b> RS <b>Município:</b> PORTO ALEGRE
<b>Telefone:</b> (51)3308-3738 <b>Fax:</b> (51)3308-4085 <b>E-mail:</b> etica@propeq.ufrgs.br

## ANEXO D (TCLE)

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Estudo sobre obesidade)**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo para conhecer melhor sobre o quanto o sobrepeso afeta medidas de envelhecimento celular em pessoas com obesidade de grau III (obesos mórbidos) submetidos à cirurgia bariátrica no período transoperatório e em voluntários saudáveis.

A obesidade mórbida – ou obesidade de grau III – definida pelo  $IMC \geq 40$ , é uma grave condição crônica de saúde que não tem uma causa única. Dentre os efeitos nocivos, a obesidade tem sido associada ao maior risco de desenvolver doenças como diabetes, hipertensão e câncer, afetando substancialmente a qualidade de vida do portador, além de possuírem uma expectativa de vida reduzida.

Apesar da importância de sabermos quais são os efeitos da obesidade, ainda são poucos os estudos que avaliaram esses efeitos sobre medidas genéticas de envelhecimento celular.

O conhecimento dos efeitos da obesidade mórbida sobre a degradação do DNA durante o processo de envelhecimento celular pode trazer amplos benefícios em termos de saúde pública, no que diz respeito à criação de medidas que objetivem evitar e controlar o excessivo aumento de peso da população em geral, visando à prevenção de diversas doenças associadas à obesidade.

Antes de consentir com sua participação, solicitamos que você leia as informações contidas neste termo de consentimento.

#### 1. QUAL É OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO?

O objetivo principal deste estudo é avaliar os efeitos da obesidade mórbida durante o processo de envelhecimento em uma população de obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica, no período transoperatório, e indivíduos saudáveis.

#### 2. COMO O ESTUDO SERÁ REALIZADO E QUAL SERÁ A MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

O paciente, ou responsável legal serão convidados a responder perguntas que revisam aspectos clínicos, sociais e de saúde, do paciente e de seus familiares. Os pacientes serão convidados a responder a dois questionários relacionados à qualidade de vida relacionada à saúde e ambiente familiar (Questionário de Qualidade de Vida-SF-36 e Questionário FACES III).

Esses questionários serão realizados por um entrevistador. Após o preenchimento dos questionários, será solicitada aos pacientes a permissão para a coleta de uma amostra de esfregaço de células da bochecha interna da boca (mucosa oral) e coleta de 1 ml de sangue do

seu braço (sangue periférico). As coletas serão realizadas por uma equipe treinada no período transoperatório.

### 3. QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a obesidade no Brasil, trazendo benefícios para a prevenção e cuidados para saúde. Estimamos um desconforto mínimo no momento da punção venosa para retirada de sangue ou do esfregaço da bochecha para a obtenção de células da mucosa interna da boca. Não prevemos maiores riscos associados a ditos procedimentos.

### 4. QUEM TERÁ ACESSO ÀS INFORMAÇÕES DESTE ESTUDO?

Os dados dos questionários e os resultados individuais dos estudos de obesidade são confidenciais e não poderão ser utilizadas para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras biológicas serão armazenadas apenas com seu registro, sem o nome ou iniciais. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem das amostras. Os Comitês de Ética e Pesquisa da PUCRS ou da UFRGS poderão ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos estão sendo protegidos.

### 5. QUAIS SÃO AS COMPENSAÇÕES DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Não haverá custos para os participantes do estudo. Você também não receberá nenhum pagamento pela participação no trabalho.

### 6. PODEREI DESISTIR DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Os participantes podem em qualquer momento cancelar sua participação no estudo. Isto não influenciará o andamento do estudo e seus resultados futuramente, nem o tratamento oferecido pela equipe responsável.

### 7. A QUEM DEVO ME DIRIGIR PARA MAIORES INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA?

Se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante do estudo, você pode ligar e contatar os responsáveis pelo estudo no telefone (51) 3308 5763 e falar com Lucas Grun ou a Dra. Florencia Barbé-Tuana. Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS (51) 3308 3738 ou PUCRS (51) 3320 3345), e contatar os coordenadores Profs. Marcelo Lazzaron Lamers e Wania Aparecida Partata, ou o Prof. Rodolfo Herberto Schneider, respectivamente.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei me retirar do estudo a qualquer momento.

#### ASSINATURAS

Sua assinatura abaixo demonstra que você recebeu e leu este termo, entendeu todas as informações relacionadas ao estudo proposto, esclareceu suas dúvidas e concordou com a sua participação em nosso estudo.

\_\_\_\_\_

Nome do paciente (ou responsável)

Se responsável: ( ) mãe ( ) pai ( ) outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Contatos: ( ) \_\_\_\_\_

( ) \_\_\_\_\_

## ANEXO E (Resumos em congressos)

1. **GRUN, L.K.**; Zatti, H.; Guma, F.C.R.; Mattiello, R.; Jones, M.H.; Barbé-Tuana, F.M. Determination of telomere length in a population of preterm children. XLIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. 2014, Foz do Iguaçu, Brasil.
2. **GRUN, L.K.**; Zatti, H.; Parisi, M.M.; Rosa, N.T.Jr.; Lavandoski, P.; Guma, F.C.R.; Mattiello, R.; Jones, M.H.; Barbé-Tuana, F.M. Avaliação do comprimento relativo de telômeros em uma população de crianças prematuras. 34<sup>a</sup> Semana Científica do HCPA. 2014, Porto Alegre, Brasil.
3. Oliveira, S.G.; Mundstock, E.; Zatti, H.; Louzada, F.M.; Barbé-Tuana, F.M.; Jones, M.H.; Fernandes, M.T.C.; **GRUN, L.K.**; Guma, F.C.R.; Mattiello, R. Associação entre o estilo de vida e comprimento dos telômeros em criança: revisão sistemática e metanálise. VII Congresso Gaúcho de Atualização em Pediatria e V Simpósio Sul-Americano de Pediatria. 2014, Porto Alegre, Brasil.
4. Zatti, H.; Barbé-Tuana, F.M.; **GRUN, L.K.**; Stein, R.T.; Mattiello, R.; Guma, F.C.R.; Parisi, M.M.; Jones, M.H. Impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros em crianças em idade escolar. 22<sup>o</sup> Congresso brasileiro de perinatologia e IX Simpósio internacional de medicina fetal da SGOB. 2014, Brasília, Brasil.
5. Barbé-Tuana, F.M.; Alves, L.B.; **GRUN, L.K.**; Stapenhorst, F.; Parisi, M.M.; Lavandoski, P.; Da Rosa, N.; Mattiello, R.; Guma, F.C.R.; Klamt, F.; Mottin, C.C.; Jones, M.H.; Padoin, A.V. Telomere shortening and mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from morbid obese patients. 9<sup>th</sup> Cold Spring Harbor meeting on Telomeres & Telomerase. 2015, New York, EUA.

## **ANEXO F (Palestra e apresentação oral em congresso)**

1. **GRUN, L. K.** Princípios básicos de PCR em tempo real. Palestra no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014 Porto Alegre, Brasil.
2. **GRUN, L.K.;** Rocha, C.C.; Guma, F.C.R.; Mattiello, R.; Jones, M.H.; Barbé-Tuana, F.M. Comprimento dos telômeros como indicador de vulnerabilidade social: biomarcador de senescência celular. 2013, Canoas, Brasil.

**ANEXO G (Manuscrito submetido e revisado com resposta aos editores)**

Effect of Obesity on Telomeres Length: Systematic Review and Meta-Analysis. Eduardo Mundstock; Edgar E. Sarria, Helen Zatti; Fernanda Mattos Louzada, Lucas Kich Grun, Marcus Herbert Jones, Fátima T. C. R. Guma, João Mazzola (in memoriam), Matías Epifanio, Renato T. Stein, Florencia M. Barbé-Tuana & Rita Mattiello. Obesity. Fator de impacto 4,389.