

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/03/2020.

Perfil de expressão de genes associados aos telômeros em carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC)

Camila Baldin Storti

BOTUCATU-SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Perfil de expressão de genes associados aos telômeros em
carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC)

Camila Baldin Storti

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós- Graduação
em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU-SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Storti, Camila Baldin.

Perfil de expressão de genes associados aos telômeros
em carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC) /
Camila Baldin Storti. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Coorientador: Patrícia Pintor dos Reis

Capes: 20200005

1. Pulmões - Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3. Carcinoma de
células escamosas. 4. Telômero. 5. Marcadores bioquímicos.
6. Proteínas de ligação a Telômeros.

Palavras-chave: Câncer de pulmão de células não pequenas
(NSCLC); biomarcadores moleculares; genes associados aos
telômeros; telômeros.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais (Leonildo e Eliana), minha irmã Luana e meus avós maternos (Arnold e Ermelinda).

Sempre me apoiaram e são meus maiores exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente à realização deste trabalho, em especial:

À minha família, a base de tudo, por todo carinho e suporte. Sem vocês nada disto seria possível.

À Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, pela orientação, ensinamentos, confiança e pelas oportunidades ao longo desses anos. E por toda contribuição em minha formação científica.

À Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis pela coorientação. Por ter aceitado a colaboração e ter aberto as portas de seu laboratório para que eu fizesse os experimentos, e por todos ensinamentos e suporte ao longo deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de telômeros, aos atuais alunos e aqueles que por ali passaram ao longo dos cinco anos em que fiz parte do laboratório. Obrigada por todos ensinamentos, trocas de experiência e por toda contribuição em minha formação científica.

À toda equipe do laboratório Neogene, obrigada por todo auxílio, ensinamentos e principalmente por terem feito eu me sentir à vontade no laboratório. Agradeço a professora Sandra Drigo por toda atenção dedicada.

Ao Dr. Márcio de Carvalho que foi fundamental para execução deste trabalho. Agradeço por toda atenção e empenho em me ensinar as técnicas e encontrar soluções para os problemas que surgiram ao longo deste trabalho. E por todas discussões científicas que muito contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Rogério de Oliveira pelas análises de bioestatística, por toda disponibilidade e atenção. E principalmente pelas inúmeras reuniões que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para meu desenvolvimento científico.

Ao Dr. Elton Vasconcelos pelas análises de bioinformática, por toda disponibilidade, paciência e ensinamentos.

À todos meus amigos, obrigada por todas conversas, trocas de experiência, desabafos e companheirismo. Vocês tornaram essa caminhada mais amena.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

À Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências de Botucatu -UNESP, por todo auxílio.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pelo auxílio financeiro e concessão de minha bolsa de mestrado, processo: 2016/06936-6.

EPÍGRAFE

DA ETERNA PROCURA

“Só o desejo inquieto, que não passa,
Faz o encanto da coisa desejada...
E terminamos desdenhando a caça
Pela doida aventura da caçada ‘’

Mario Quintana

RESUMO

O câncer de pulmão é o câncer que apresenta maior mortalidade no mundo: >1,6 milhões de óbitos por ano segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) o tipo mais frequente (~ 85%) de carcinoma pulmonar. O NSCLC apresenta dois subtipos histológicos principais: adenocarcinoma (LUAD) e carcinoma de células escamosas (LUSC). Pesquisas têm sido realizadas objetivando identificar biomarcadores moleculares úteis como alvo terapêuticos em NSCLC e os telômeros têm sido considerado alvos promissores para terapias antitumoral, devido ao seu papel crucial na integridade, estabilidade e manutenção genômica. Telômeros humanos consistem em DNA repetitivo rico em G associado a proteínas do complexo *shelterin* e mantido pela ação da telomerase. Estudos recentes mostraram que a expressão de *TERT* (subunidade catalítica da telomerase) e de alguns componentes do complexo *shelterin* estão alterados em câncer de pulmão. No entanto, a correlação entre alterações na função telomérica e o desenvolvimento e progressão de NSCLC não foi elucidada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar alterações na expressão de genes associados aos telômeros, incluindo os ncRNAs associados à regulação e manutenção dos telômeros em NSCLC, no intuito de identificar novos biomarcadores associados ao desenvolvimento e progressão do NSCLC. Para tanto, foram realizadas análises de expressão de 50 genes associados aos telômeros em amostras de tecido tumoral e tecido pulmonar normal, adjacente ao tumor, de pacientes com NSCLC, utilizando 1) RT-qPCR para análise de expressão em amostras de 28 pacientes, tratados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2) Análise de transcrito utilizando dados de RNA-Seq de amostras de 27 pacientes tratados no Hospital A. C. Camargo e 3) Análise de transcrito utilizando dados de RNA-Seq, disponíveis no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e obtidos de amostras de 85 pacientes. Adicionalmente foram analisadas as diferenças entre o perfil de expressão dos genes avaliados em amostras do subtipo LUSC e LUAD. Os resultados revelaram que genes envolvidos com a manutenção dos telômeros estão significativamente, $p \leq 0,05$, desregulados nos tumores NSCLC avaliados. Com destaque para os genes *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1* e *BRCA2* que foram identificados com expressão aumentada nas células tumorais de NSCLC em relação as normais, na maioria das análises. E para os genes *SUV39H1*, *RUVBL1* e *DNMT3A* que apresentaram aumento de expressão significativo apenas nas amostras do subtipo LUSC. Os ncRNA *TERC* e *TERRA* apresentaram expressão elevada nas amostras de NSCLC, destacando a alta expressão de *TERC* associada ao subtipo LUSC. Somado a estas análises foi calculado o perfil de restrição telomérico (TRF) de amostras tumorais (n=11) e normais adjacentes ao tumor (n=4) de pacientes com NSCLC, e os TRFs de leucócitos de pacientes com NSCLC (n= 14) em comparação com os de doadores saudáveis (n=13). Os telômeros de leucócitos de pacientes com NSCLC estavam menores que os de indivíduos saudáveis ($p \leq 0,05$) e os telômeros diminuía conforme a idade do paciente (correlação de *Spearman*, $p = 0,00$ e $r = -0,644$). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de TRF dos tecidos tumorais e normais de pacientes com NSCLC, tal como não foi identificado correlação entre o tamanho de TRF e a idade destes indivíduos, provavelmente devido ao baixo número amostral. Os resultados sugerem que os genes que codificam proteínas e ncRNAs envolvidos com a manutenção dos telômeros podem estar envolvidos na oncogênese de NSCLC e que dentre eles podem haver potenciais biomarcadores para NSCLC, sobretudo do subtipo LUSC, visto a expressão aumentada de alguns genes, *SUV39H1*, *RUVBL1*, *DNMT3A* e *TERC*, estarem exclusivamente associadas a amostras tumorais deste subtipo.

Palavras chaves: Câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), telômeros, biomarcadores moleculares, genes associados aos telômeros.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, lung cancer has a high mortality rate associated with >1.6 million deaths per year, being Non-small cell lung cancer (NSCLC) the most frequent type (~ 85%) of lung carcinoma. Lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma (LUSC) are the two major histological subtypes of NSCLC. Research efforts have been made to identify molecular biomarkers useful as therapeutic targets in NSCLC and telomere have been considered very promising targets for anticancer therapies due to their crucial role in genome integrity maintenance and stability. Human telomeres consist of repetitive G-rich DNA associated with proteins of the shelterin complex, maintained by the action of telomerase. Recent studies showed that expression of *TERT* (telomerase reverse transcriptase component) and of some of the shelterin components are altered in lung cancer. However, the mechanisms of telomere deregulation associated with NSCLC development and progression have not been elucidated. Therefore, our aim was to study expression changes affecting telomere-associated genes and ncRNAs associated with telomere regulation and maintenance in NSCLC. Such alterations may represent novel biomarkers associated with NSCLC development and progression. For this purpose, expression analyzes of 50 telomere-associated genes were performed in samples of tumor tissue and normal lung tissue, adjacent to the tumor, from patients with NSCLC. The following techniques were used: 1) RT-qPCR for analysis of expression in samples obtained from 28 patients who underwent surgical treatment at Botucatu Clinical Hospital; 2) Transcriptome analysis using RNA-Seq data from samples obtained from 27 patients treated at AC Camargo Hospital 3) Transcriptome analysis using RNA-Seq data, available in the The Cancer Genome Atlas database (TCGA) and obtained from samples of 85 patients. In addition, the differences between the expression profile of the telomere-associated genes in LUSC and LUAD subtype samples were analyzed. The results revealed that many genes involved in telomeres maintenance are significantly, ≤ 0.05 , deregulated in the NSCLC tumors. Genes encoding *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1* and *BRCA2* were overexpressed in NSCLC tumor cells compared to the normal lung tissue. *SUV39H1*, *RUVBL1* and *DNMT3A* genes were overexpressed only in LUSC subtype samples. The ncRNAs *TERC* and *TERRA* also showed increased expression in NSCLC samples, with emphasis to the high expression level of *TERC* associated with the LUSC subtype. In addition, telomere restriction fragment (TRF) was estimated for tumor tissue (n=11) and normal lung tissue (n=4) samples obtained from patients with NSCLC. TRFs from leukocytes obtained from patients with NSCLC (n= 14) were also compared with TRFs obtained from healthy donors (n = 13). The results showed that telomeres of leukocytes obtained from NSCLC patients were shorter than those of healthy donors ($p \leq 0.05$) and it decreases according to patient's age (Spearman's correlation, $p = 0.00$ and $r = -0,644$). However, no significant difference was found between the TRF obtained from tumor and normal lung tissues of patients with NSCLC, as no correlation was found when comparing TRFs and the age of these individuals, probably due to the low sample size. The results suggest that genes encoding proteins and ncRNAs involved in the maintenance of telomeres may be involved in the oncogenesis of NSCLC, especially the LUSC subtype, since the increased expression of some genes, *SUV39H1*, *RUVBL1*, *DNMT3A* and *TERC*, are exclusively associated with tumor samples of this subtype.

Key words: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), telomeres, molecular biomarkers, telomere-associated genes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura telomérica e ação conjunta dos complexos <i>shelterin</i> e CST na manutenção telomérica _____	20
Figura 2 - Mecanismos de reparo a danos no DNA por junção de pontas não homólogas _____	22
Figura 3 - Os três tipos de reparo por recombinação homóloga nos telômeros _____	24
Figura 4 - Papel dos telômeros durante a carcinogênese _____	26
Figura 5 - Representação esquemática dos métodos utilizados nesse trabalho para análise de expressão gênica de genes associados aos telômeros em amostras tumorais e normais adjacentes ao tumor de pacientes com NSCLC _____	41
Figura 6 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa ($\log_{10}$) em tumor vs normal _____	46
Figura 7 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa ($\log_{10}$) dos RNAs teloméricos não codantes em tumor vs normal _____	56
Figura 8 - Gráficos representativos da expressão relativa ($\log_{10}$) dos genes teloméricos nos diferentes grupos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC _____	60
Figura 9 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa ($\log_{10}$) de RNAs teloméricos não codantes nos diferentes grupos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC _____	68
Figura 10 - <i>Heatmap</i> do perfil de expressão gênica em tumores dos subtipos LUSC e LUAD _____	70
Figura 11 - Rede de interação de proteínas envolvidas com a manutenção dos telômeros _____	71
Figura 12 - Gráfico do tipo <i>Heatmap</i> . Mostrando a diferença do perfil de expressão dos genes associados aos telômeros em amostras do subtipo LUSC e LUAD, cujos dados de transcrito foram retirados do TCGA _____	81
Figura 13 - Sobreposições dos genes com expressão aumentada ($FC \geq 1$, $p \leq 0,05$ e $FDR \leq 0,05$) em LUAD e LUSC, dados obtidos do TCGA _____	82
Figura 14 - Perfil de TRF de tecidos tumorais e normais adjacentes ao tumor, de pacientes com NSCLC _____	84
Figura 15 - Correlação entre o TRF de células tumorais (NSCLC) e normais adjacentes e a idade dos pacientes _____	86
Figura 16 - Perfil de TRF da fração leucocitária de pacientes com NSCLC _____	87

Figura 17 - Correlação entre o TRF de leucócitos de pacientes com NSCLC e de doadores saudáveis e a idade dos indivíduos _____ 88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vias celulares que possuem a atividade afetada por alterações somáticas em pacientes com câncer de pulmão _____	17
Tabela 2 - Lista dos genes e sequências dos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR _____	37
Tabela 3 - Perfil clínico e histopatológico dos casos incluídos no estudo de expressão gênica via RT-qPCR _____	43
Tabela 4 - Expressão relativa de genes envolvidos com a maquinaria telomérica em amostras de NSCLC _____	45
Tabela 5 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em amostras de NSCLC _____	55
Tabela 6 - Expressão relativa de genes envolvidos com os telômeros em adenocarcinoma pulmonar (LUAD) _____	58
Tabela 7 - Expressão relativa de genes envolvidos com os telômeros em carcinoma pulmonar de células escamosas (LUSC) _____	59
Tabela 8 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em adenocarcinoma pulmonar (LUAD) _____	67
Tabela 9 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em carcinoma pulmonar de células escamosas (LUSC) _____	67
Tabela 10- Perfil clínico e histopatológico dos pacientes do Hospital AC. Camargo diagnosticados com LUAD _____	72
Tabela 11 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com LUAD, análise de transcrito utilizando dados de RNA- Seq _____	72
Tabela 12 - Características dos pacientes com NSCLC, cujos dados de transcrito foram retirados do banco de dados público: <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA) _____	75
Tabela 13 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com subtipo tumoral LUSC, cujos dados foram extraídos do TCGA _____	76
Tabela 14 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com subtipo tumoral LUAD, cujos dados foram extraídos do TCGA _____	79

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Genes envolvidos com a manutenção telomérica que estão diferencialmente expressos em NSCLC	90
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
1.1 Características biológicas e genéticas do câncer.....	14
1.2 Câncer de Pulmão.....	15
1.2.1 Alterações genéticas e moleculares em NSCLC	15
1.3 Telômeros e Características Gerais	19
1.4 Telômeros e câncer	25
1.4.1 Câncer e o complexo <i>Shelterin</i>	27
1.4.2 Câncer e proteínas teloméricas não <i>Shelterins</i>	28
1.4.3 Telômeros e câncer de pulmão	29
2 OBJETIVO GERAL DA PROPOSTA.....	33
2.1 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Dados das amostras	34
3.2 Metodologia de extração de RNA.....	35
3.3 Metodologia de extração de DNA.....	35
3.4 Metodologia de validação de alterações na expressão de genes associados a maquinaria telomérica: PCR quantitativa em tempo real	35
3.5 Análises estatísticas dos dados (RT-qPCR).....	37
3.6. Análise bioinformática dos dados de RNA-Seq	38
3.7. Metodologia para medir o perfil de restrição do comprimento telomérico (Southern blot telomérico)	39
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC	42
5.1.1 Investigação de alterações na expressão de RNAs teloméricos não codantes em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC	54
5.2 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas nos subtipos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC	57

5.2.1 Investigação de alterações na expressão de RNAs teloméricos não codantes nos subtipos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC.....	67
5.2.2 Diferenças nos perfis de expressão dos genes associados aos telômeros em amostras de pacientes com LUSC e LUAD.....	69
5.3 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica em amostras tumorais de pacientes diagnosticados com NSCLC, por análise de transcrito utilizando dados de bibliotecas RNA-Seq.....	71
5.4 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica em amostras tumorais de pacientes com LUAD, por análise de transcrito utilizando dados de RNA- Seq	71
5.5 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	75
5.5.1 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do TCGA- LUSC.....	76
5.5.2 Análise de expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do TCGA- LUAD	79
5.6 Análise do perfil de restrição telomérico em amostras de pacientes diagnosticados com NSCLC	83
6 CONCLUSÃO.....	89
7 REFERÊNCIAS.....	922
8 ANEXOS.....	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Características biológicas e genéticas do câncer

O câncer compreende mais de 100 doenças que se originam a partir da divisão celular anormal (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e mais de 8 milhões de óbitos por ano, no mundo (STEWART; WILD, 2014).

O câncer é uma doença genética associada ao acúmulo de mutações somáticas, as quais interferem em vias moleculares que regulam o crescimento e diferenciação celulares, apoptose, reparo do DNA, entre outras (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; GRIFFITS, 2008; ALBERTS et al., 2011). As alterações genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento e progressão tumoral fornecem vantagens competitivas às células devido à aquisição de propriedades celulares de crescimento mesmo na presença de danos ao DNA e na ausência de sinais reguladores da divisão celular ou pela capacidade de secretar fatores de crescimento pela célula tumoral, capacidade de estimular mecanismos de angiogênese, aquisição de imortalidade celular e reativação da telomerase, esta última propriedade ocorrendo em pelo menos 85% dos tumores (ALBERTS, 2011). A homeostasia dos tecidos e do organismo pode ser rompida quando uma célula sofre alterações genéticas, que lhe confere imortalização e capacidade de proliferação indeterminada, resultando na expansão clonal observada no desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; ALBERTS et al., 2011).

As alterações observadas em células tumorais resultam da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e exposição a fatores ambientais, dos quais muitos foram classificados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2017). O consumo de tabaco e álcool, dieta rica em gordura e sedentarismo são alguns dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer. Alguns vírus também estão associados ao câncer, como os vírus da Hepatite B (HBV) e hepatite C (VHC), associados ao desenvolvimento de hepatocarcinoma, e do papiloma humano (HPV), associado aos carcinomas do colo do útero e orofaringe (“WHO | Cancer”, 2017).

6 CONCLUSÃO

Genes que codificam proteínas e ncRNAs com função na maquinária telomérica foram identificados diferencialmente expressos nas amostras tumorais de NSCLC avaliadas, sugerindo que, alterações na manutenção dos telômeros podem estar envolvidas na oncogênese de NSCLC. Identificou-se entre eles, genes que codificam proteínas com função de reparo: RPA3, RBBP8, PARP1, RAD51, BRCA2 e ATR, metilação: DNMT3A, DNMT3B e DNMT1, regulação epigenética: SUV39H1 e SUV420H2, regulação e biogênese do complexo telomerase: TERT, DKC1 RUVBL1 RUVBL2, HSP90AA1, SMG6 (EST1A) e o componente do complexo *shelterin* POT1, que auxilia no recrutamento de TERT aos telômeros. Nas amostras dos pacientes com NSCLC, também foi identificada expressão elevada do RNA TERC, componente essencial do complexo telomerase, e do lncRNA TERRA 20q, envolvido com a manutenção e integridade dos telômeros.

Os resultados obtidos estão resumidos no Quadro 1, de acordo com os genes que apresentaram expressão aumentada ($p \leq 0,05$) nas amostras tumorais em relação às normais adjacentes, analisadas pela RT-qPCR, bem como os genes identificados com expressão aumentada ou diminuída ($p \leq 0,01$, $FDR \leq 0,01$ e $FC \geq 1$ ou ≤ -1) nas análises dos dados de transcriptoma utilizando RNA-Seq.

Quadro 1 - Genes envolvidos com a manutenção telomérica que estão diferencialmente expressos em NSCLC

Genes com expressão alterada	Pacientes de outros países		Pacientes brasileiros			
	TCGA (RNA-Seq) LUSC	TCGA (RNA-Seq) LUAD	RNA-Seq LUAD	RT-qPCR NSCLC	RT-qPCR LUSC	RT-qPCR LUAD
<i>TERT</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↑
<i>RAD51</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔
<i>DNMT3B</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔
<i>DKC1</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔
<i>BRCA2</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔
<i>SUV39H1</i>	↑	↔	↔	↑	↑	↔
<i>RUVBL1</i>	↑	↔	↔	↑	↑	↔
<i>RUVBL2</i>	↑	↔	↑	↑	↑	↔
<i>DNMT3A</i>	↑	↔	↔	↑	↑	↔
<i>POT1</i>	↔	↔	↔	↑	↑	↔
<i>MRE11</i>	↔	↔	↔	↑	↑	↔
<i>RPA3</i>	↔	↔	↑	↑	↑	↔
<i>DAXX</i>	↔	↔	↔	↔	↑	↔
<i>HSP90AA</i>	↔	↔	↔	↔	↑	↔
<i>SMG6</i>	↔	↔	↓	↔	↔	↔
<i>TERC</i>	↔	↔	↔	↑	↑	↔
<i>TERRA 20q</i>	não analisado	não analisado	não analisado	↑	↑	↔
<i>TERRA1q2q10q13q</i>	não analisado	não analisado	não analisado	↑	↑	↔
<i>RBBP8</i>	↑	↔	↔	não analisado	não analisado	não analisado
<i>PARP1</i>	↑	↑	↔	não analisado	não analisado	não analisado
<i>SUV420H</i>	↑	↔	↔	não analisado	não analisado	não analisado
<i>ATR</i>	↑	↔	↔	não analisado	não analisado	não analisado
<i>DNMT1</i>	↑	↔	↔	não analisado	não analisado	não analisado

Nota: As setas para cima indicam genes com expressão aumentada e a seta para baixo indica um gene com expressão diminuída em amostras tumorais em relação as amostras normais adjacentes. (↔) indica genes que não apresentaram alteração de expressão. Análise considerando $FC \geq 1$ ou ≤ -1 . Valor de $p \leq 0,01$ e $FDR \geq 0,01$.

De acordo, com o Quadro 1, conclui-se que, os tumores NSCLC avaliados são em sua maioria telomerase positivo, visto que, em todas as análises o gene *TERT* foi identificado com alta expressão nas células tumorais quando comparado com as células dos tecidos pulmonares normais. Com destaque para os genes *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1* e *BRCA2* que foram identificados com expressão aumentada nas células tumorais de NSCLC em relação as normais, na maioria das análises. Esses genes e o *TERT*, foram os que apresentaram maiores valores de expressão nas amostras de NSCLC avaliadas, sugerindo que dentre eles podem haver potenciais biomarcadores para NSCLC, e que esses tumores reativam a telomerase como mecanismo para restabelecer a estabilidade telomérica, e sofrem ação massiva de mecanismos de reparo homólogos à danos nos telômeros.

Verificou-se que existem diferenças entre os perfis de expressão dos genes associados aos telômeros nos subtipos histológicos LUSC e LUAD, visto que, foi identificado um maior número de genes diferencialmente expressos em LUSC, além da expressão aumentada de genes, que têm sido identificados como importantes para o processo de oncogênese em NSCLC, terem sido somente identificadas nas amostras do subtipo LUSC. Fatores que evidenciam que os genes com função telomérica podem ter um papel maior no processo de oncogênese em LUSC quando comparado a LUAD, e que dentre esses genes podem haver marcadores moleculares específicos para o subtipo LUSC. Destacam-se, entre eles, os genes *SUV39H1*, *RUVBL1* *DNMT3A*, essenciais à maquinaria telomérica, que foram identificados com expressão elevada exclusivamente no subtipo LUSC em todas análises realizadas. E o gene *TERC*, componente essencial do complexo telomerase, que foi identificado altamente expresso no grupo amostral de LUSC de pacientes brasileiros (dados de RT-qPCR), corroborando com dados de estudos prévios que identificaram expressão elevada de *TERC* associada ao subtipo LUSC, e que sugerem que *TERC* pode ser diferencialmente regulado durante o processo de oncogênese nos diferentes subtipos histológicos de carcinoma pulmonar.

Portanto, o presente estudo forneceu e reforçou evidências sobre a relevância de genes com função telomérica para a doença, e que dentre eles podem haver potenciais biomarcadores para NSCLC, sobretudo para o subtipo LUSC, fato de grande importância, pois atualmente faltam alvos moleculares específicos para LUSC. Identificou-se também que, os telômeros de leucócitos de pacientes com NSCLC são menores do que os telômeros de indivíduos saudáveis e que os telômeros diminuem de acordo com a idade do indivíduo, contribuindo para esclarecer dados contraditórios da literatura.

7 REFERÊNCIAS

ALAWI, F.; LIN, P. Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 5, p. 334–345, 2011.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALLSHIRE, R. C.; DEMPSTER, M.; HASTIE, N. D. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 12, p. 4611–4627, 1989.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.

ANTONIOU, K. M. et al. Differential telomerase expression in idiopathic pulmonary fibrosis and non-small cell lung cancer. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2617–2624, 2013.

ARMANIOS, M.; BLACKBURN, E. H. The telomere syndromes. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 10, p. 693–704, 2012.

ARORA, R.; BRUN, C. M.; AZZALIN, C. M. Transcription regulates telomere dynamics in human cancer cells. **RNA (New York)**, v. 18, n. 4, p. 684–693, 2012.

AUBERT, G.; LANSDORP, P. M. Telomeres and aging. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 557–579, 2008.

AVIV, A.; LEVY, D.; MANGEL, M. Growth, telomere dynamics and successful and unsuccessful human aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, n. 7, p. 829–837, 2003.

AZZALIN, C. M. et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2007.

BADIE, S. et al. BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 12, p. 1461–1469, 2010.

BAINBRIDGE, M. N. et al. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 1, p. 384, 2015.

BABRAHAM INSTITUTE. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2013.

BENETTI, R. et al. Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. **Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 6, p. 925–936, 2007.

BERASAIN, C. New therapeutic targets in HCC: Reptin ATPase and HCC senescence. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 633–634, 2010.

BIAOXUE, R. et al. Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 31, p. 70, 2012.

BISOFFI, M.; HEAPHY, C. M.; GRIFFITH, J. K. Telomeres: prognostic markers for solid tumors. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 10, p. 2255–2260, 2006.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 611–622, 2005.

BODELON, C.; SAVAGE, S. A.; GADALLA, S. M. Telomeres in molecular epidemiology studies. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 125, p. 113–131, 2014. Review.

BOUTROS, P. C. et al. Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 2824–2828, 2009.

BOSKEN, C. H. et al. An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 14, p. 1091–1099, 2002.

BREATHNACH, O. S. et al. Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering results. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1734–1742, 2001.

BREIG, O. et al. Pontin is a critical regulator for AML1-ETO-induced leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1271–1279, 2014.

BREIG, O. et al. Metalloproteinase meprin α regulates migration and invasion of human hepatocarcinoma cells and is a mediator of the oncoprotein Reptin. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7839–7851, 2017.

BRENNAN, P.; HAINAUT, P.; BOFFETTA, P. Genetics of lung-cancer susceptibility. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 4, p. 399–408, 2011.

BRYAN, T. M. et al. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. **Nature Medicine**, v. 3, n. 11, p. 1271–1274, 1997.

CALADO, R. T. Telomeres in Health and Disease. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 125, jan. 2014.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic

characterization of squamous cell lung cancers. **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 519–525, 2012.

CELLI, G. B.; DE LANGE, T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 712–718, 2005.

CESARE, A. J. et al. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. **Molecular Cell**, v. 51, n. 2, p. 141–155, 2013.

CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–121, 2004.

CHANG, L. Y. et al. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in oral carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 9, p. 389–396, 1999.

CHEN, K.-Y. et al. Elevation of telomerase activity positively correlates to poor prognosis of patients with non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 240, n. 1, p. 148–156, 2006.

CHEN, L. Y.; LINGNER, J. CST for the grand finale of telomere replication. **Nucleus**, v. 4, n. 4, p. 277–282, 2013.

CHIN, L. et al. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 527–538, 1999.

CHIU, C. P. et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. **Stem Cells**, v. 14, n. 2, p. 239–248, 1996.

CHRISTODOULOPOULOS, G. et al. Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 8, p. 2178–2184, 1999.

COLLINS, K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 484–494, 2006.

COUNTER, C. M. et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. **Oncogene**, v. 16, n. 9, p. 1217–1222, 1998.

CROSS, S. H. et al. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. **Nature**, v. 338, n. 6218, p. 771–774, 1989.

CUI, F. et al. Grifola frondosa glycoprotein GFG-3a Arrests S phase, alters proteome, and induces apoptosis in human gastric cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 2, p. 267–279, 2016.

DAHAI, Y. et al. A relationship between replication protein a and occurrence and

prognosis of esophageal carcinoma. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 1, p. 175–180, 2013.

DANILOSKI, Z.; SMITH, S. Loss of tumor suppressor STAG2 promotes telomere recombination and extends the replicative lifespan of normal human cells. **Cancer Research**, v. 77, n. 20, p. 5530–5542, 2017.

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

DEHAN, E. et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 56, n. 2, p. 175–184, 2007.

DI CROCE, L. Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by an Oncogenic Transcription Factor. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1079–1082, 2002.

DJOJOSUBROTO, M. W. et al. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. **Molecules and Cells**, v. 15, n. 2, p. 164–175, 2003.

FARAZI, P. A. et al. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 63, n. 16, p. 5021–5027, 2003.

FARNUNG, B. O. et al. Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

FERNANDEZ-GARCIA, I. et al. Multiscale in situ analysis of the role of dyskerin in lung cancer cells. **Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro**, v. 5, n. 2, p. 402–413, 2013.

FERNÁNDEZ-MARCELO, T. et al. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 78, 2015.

FRÍAS, C. et al. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 60, n. 3, p. 416–425, 2008.

FUJITA, Y. et al. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 98, n. 5, p. 1008–1013, 2003.

GANSNER, J. M.; ROSAS, I. O. Telomeres in lung disease. **Translational Research : the Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 162, n. 6, p. 343–352, 2013.

GAO, H. et al. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 14, n. 3, p. 208–214, 2007.

GAO, Q. et al. Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung

tumor progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 44, p. 18061–18066, 2011.

GARCÍA-BECCARIA, M. et al. Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 930–949, 2015.

GARCÍA-CAO, M. et al. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. **Nature Genetics**, v. 36, n. 1, p. 94–99, 2003.

GIARDINI, M. A. et al. Telomere and telomerase biology. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 125, p. 1–40, 2014.

GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825–838, 2007.

GIVALOS, N. et al. Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. **Modern Pathology**, v. 20, n. 2, p. 159–166, 2007.

GONZÁLEZ-QUEVEDO, R. et al. Cooperative role of telomerase activity and p16 expression in the prognosis of non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 254–262, 2002.

GONZÁLEZ-SUÁREZ, E. et al. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. **Nature Genetics**, v. 26, n. 1, p. 114–117, 2000.

GONZALO, S. et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 416–424, 2006.

GREENBERG, R. A. et al. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 515–525, 1999.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HAI, J. et al. L1 Cell Adhesion Molecule Promotes Tumorigenicity and Metastatic Potential in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 7, p. 1914–1924, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HÄRLE-BACHOR, C.; BOUKAMP, P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**

of America, v. 93, n. 13, p. 6476–6481, 1996.

HAURIE, V. et al. Adenosine triphosphatase Pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with Reptin through a new posttranslational mechanism. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1871–1883, 2009.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, p. 614–636, 1965.

HEAPHY, C. M. et al. Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 10, p. 1130–1141, 2013.

HENNING, W.; STÜRZBECHER, H. W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 91-109, 2003.

HIRASHIMA, T. et al. Prognostic significance of telomeric repeat length alterations in pathological stage I-IIIa non-small cell lung cancer. **Anticancer Research**, v. 20, n. 3B, p. 2181-2187, 2000.

HIYAMA, K. et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. **Journal of immunology (Baltimore)**, v. 155, n. 8, p. 3711–3715, 1995.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-374, 2001.

HOSGOOD, H. D. et al. Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length, and lung cancer susceptibility. **Lung Cancer**, v. 66, n. 2, p. 157–161, 2009.

HOXHA, M. et al. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, p. 612-621, 2014.

HSIAO, S. J.; SMITH, S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. **Biochimie**, v. 90, n. 1, p.83-92, 2008. Review.

HSU, C.-P. et al. Concordant expression of the telomerase-associated genes in non-small cell lung cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 29, n. 7, p. 594–599, 2003.

HSU, C.-P. et al. Modulation of telomere shelterin by TRF1 [corrected] and TRF2 interacts with telomerase to maintain the telomere length in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 58, n. 3, p. 310–316, 2007a.

HSU, C. P. et al. Correlation between telomerase expression and terminal restriction fragment length ratio in non-small cell lung cancer--an adjusted measurement and its clinical significance. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 26, n. 2, p. 425–431, 2004.

HSU, C. P. et al. Modulation of telomere shelterin by TFR1 and TRF2 interacts with

telomerase to maintain the telomere length in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 58, n. 3, p. 310–316, 2007b.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Câncer**: tipo - pulmão. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/definicao>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. 2017. p. 1–12, Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 20 nov. 2017

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report 2014**. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=80&codcch=275>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

JACOBS, J. J. L. Loss of telomere protection: consequences and opportunities. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 88, 2013.

JANG, J. S. et al. Telomere length and the risk of lung cancer. **Cancer Science**, v. 99, n. 7, p. 1385–1389, 2008.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011

KARAMI, S. et al. Telomere structure and maintenance gene variants and risk of five cancer types. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 12, p. 2655–2670, 2016.

KARLSEDER, J. et al. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. **Science**, v. 283, n. 5406, p. 1321–1325, 1999.

KILLELA, P. J. et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 15, p. 6021–6026, 2013.

KIM, N. W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, v. 266, n. 5193, p. 2011–2015, 1994.

KIM, D. et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v. 14, n. 4, p. R36, 2013.

KIM, S.-H. et al. High-level expression of Hsp90 β is associated with poor survival in resectable non-small-cell lung cancer patients. **Histopathology**, v. 67, n. 4, 2015.

KIMURA, M. et al. Measurement of telomere length by the southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. **Nature Protocols**, v. 5, n. 9, p. 1596–1607, 2010.

KIRWAN, M.; DOKAL, I. Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. **Clinical Genetics**, v. 73, n. 2, p. 103–112, 2008.

- KO, J.-C. et al. Role of repair protein Rad51 in regulating the response to gefitinib in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 11, p. 3632–3641, 2008a.
- KO, J.-C. et al. Involvement of Rad51 in cytotoxicity induced by epidermal growth factor receptor inhibitor (gefitinib, IressaR) and chemotherapeutic agents in human lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 7, p. 1448–1458, 2008b.
- LA TORRE, D. et al. Potential clinical role of telomere length in human. **Brain**, v. 1, n. 1, p. 243–270, 2011.
- LAI, S.L. et al. Modulation of cisplatin resistance in acquired-resistant nonsmall cell lung cancer cells. **Oncology Research**, v. 7, p. 31–38, 1995.
- LAN, Q. et al. Longer telomere length in peripheral white blood cells is associated with risk of lung cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) polymorphism in a prospective cohort study among women in China. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59230, 2013.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.
- LARSEN, J. E.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p. 703–740, 2011.
- LAUSCHER, J. C. et al. Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue. **Human Pathology**, v. 38, n. 7, p. 978–985, 2007.
- LAUSCHER, J. C. et al. Increased Pontin expression is a potential predictor for outcome in sporadic colorectal carcinoma. **Oncology Reports**, v. 28, n. 5, p. 1619–1624, 2012.
- LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Stop pulling my strings-what telomeres taught us about the DNA damage response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 364–378, 2016.
- LECHEL, A. et al. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. **EMBO reports**, v. 6, n. 3, p. 275–281, 2005.
- LECHEL, A. et al. Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1465–1475, 2007.
- LEE, J. H. et al. Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 8, 2015.
- LEVIDOU, G. et al. Prognostic significance of replication protein A (RPA) expression levels in bladder urothelial carcinoma. **BJU International**, v. 108, n. 2 B, p. 59–65, 2011.
- LI, W. et al. Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 132, 2010.

LI, Y. et al. Overexpression of Rad51 predicts poor prognosis in colorectal cancer: our experience with 54 patients. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. e0167868, 2017.

LIN, X. et al. Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 19, p. 5720–5725, 2006.

LIU, B. et al. Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

LIU, D. et al. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51338–51342, 2004.

LIU, X. et al. Chaetocin induces endoplasmic reticulum stress response and leads to death receptor 5-dependent apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. **Apoptosis**, v. 20, n. 11, p. 1499–1507, 2015.

LIU, Y. et al. Preferential maintenance of critically short telomeres in mammalian cells heterozygous for mTert. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3597–602, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOCKWOOD, W. W. et al. Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e1000315, 2010.

LONDOÑO-VALLEJO, J. A.; WELLINGER, R. J. Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 9, p. 391–399, 2012.

LONGO, D. et al. **Harrison's principles of internal medicine**. 18. ed. New York: McGraw, 2011. Cap. 89.

MAACKKE, H. et al. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 19, n. 23, p. 2791–2795, 2000a.

MAACKKE, H. et al. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 88, n. 6, p. 907–913, 2000b.

MAO, Y.-Q.; HOURY, W. A. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 58, 2017. Review.

MARCHETTI, A. et al. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small

cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 8, p. 2077–2081, 1999.

MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M. A. Role of shelterin in cancer and aging. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 653–666, 2010.

MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M. A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 3, p. 161–176, 2011.

MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M. A. Replicating through telomeres: a means to an end. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 9, p. 504–515, 2015.

MASON, P. J.; BESSLER, M. The genetics of dyskeratosis congenita. **Cancer Genetics**, v. 204, n. 12, p. 635–645, 2011.

MEEKER, A. K. et al. Telomere shortening occurs in subsets of normal breast epithelium as well as in situ and invasive carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 3, p. 925–935, 2004.

MEYERSON, M. et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 785–795, 1997.

MIELINSKI, M. et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1107–1120, 2012.

MILONE, M. R. et al. Proteomic characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) overexpressing or silenced colorectal cancer cells unveils a novel protein network associated with an aggressive phenotype. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 8, p. 9–18, 2016.

MOLCKOVSKY, A.; SIU, L. L. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 1, p. 1–9, 2008.

MONTANARO, L. et al. Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer. **Cellular Oncology**, v. 30, n. 6, p. 483–490, 2008.

MONTERO J. J.; LÓPEZ DE SILANES, I.; GRAÑA O. B. M. A. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. **Nature Communications**, v. 7, p. 12534, 2016.

MOYZIS, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) $_n$, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 18, p. 6622–6626, 1988.

NAKANO, K.; WATNEY, E.; MCDOUGALL, J. K. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 857–864, 1998.

NAKASHIMA, M. et al. Inhibition of telomerase recruitment and cancer cell death. **The**

Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 46, p. 33171–33180,

NANDAKUMAR, J. et al. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. **Nature**, v. 492, n. 7428, p. 285–289, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. The cancer genome atlas -TCGA. Disponível em: <<http://cancergenome.nih.gov/>>. Acesso em: 20 out 2017.

NERGADZE, S. G. et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA (New York)**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 2009.

OGANESIAN, L.; KARLSEDER, J. Mammalian 5'C-Rich Telomeric Overhangs Are a Mark of Recombination-Dependent Telomere Maintenance. **Molecular Cell**, v. 42, n. 2, p. 224–236, 2011.

O'SULLIVAN, J. et al. Telomere length in the colon declines with age: A relation to colorectal cancer? **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 15, n. 3, p. 573–577, 2006.

O'SULLIVAN, J. N. et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. **Nature Genetics**, v. 32, n. 2, p. 280–284, 2002.

O'SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 171–181, 2010.

OCAK, S. et al. Discovery of new membrane-associated proteins overexpressed in small-cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 9, n. 3, p. 324–336, 2014.

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

OSAKI, H. et al. The AAA+ ATPase RUVBL2 is a critical mediator of MLL-AF9 oncogenesis. **Leukemia**, v. 27, n. 7, p. 1461–1468, 2013.

OUELLETTE, M. M.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Targeting telomerase-expressing cancer cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 7, p. 1433–1442, 2011.

PANERO, J. et al. Differential expression of non-shelterin genes associated with high telomerase levels and telomere shortening in plasma cell disorders. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

PFEIFFER, V.; LINGNER, J. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002747, 2012.

PONCET, D. et al. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 111, n. 4, p.

2388–2391, 2008.

QIAO, G.-B. et al. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 1, p. 137–143, 2005.

RAMPAZZO, E. et al. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 8, p. 1300–1305, 2010.

RAMSAY, A. J. et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. **Nature Genetics**, v. 45, n. 5, p. 526–530, 2013.

RAYMOND, A.-A. et al. Reptin regulates DNA double strand breaks repair in human hepatocellular carcinoma. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. e0123333, 2015.

REICHENBACH, P. et al. A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. **Current Biology**, v. 13, n. 7, p. 568–574, 2003.

REN, J. et al. Overexpression of Reptin in renal cell carcinoma contributes to tumor malignancies and its inhibition triggers senescence of cancer cells. **Urologic Oncology**, v. 31, n. 7, p. 1358–1366, 2013.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2009.

ROBLES-ESPINOZA, C. D. et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 478–481, 2014.

RUDEN, M.; PURI, N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 5, p. 444–456, 2013.

RUDOLPH, K. L. et al. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. **Nature Genetics**, v. 28, n. 2, p. 155–159, 2001.

SAVAGE, S. A. Human telomeres and telomere biology disorders. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 125, p. 41–66, 2014.

SCHAETZLEIN, S.; RUDOLPH, K. L. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 17, n. 1–2, p. 85–96, 2005.

SCHEIBE, M. et al. Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. **Genome Res.**, v. 23, n. 12, p. 2149–2157, 2013.

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

SEXTON, A. N. et al. Genetic and molecular identification of three human TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. **Genes & Development**, v. 28, n. 17, p. 1885–1899, 2014.

SEXTON, A. N.; YOUMANS, D. T.; COLLINS, K. Specificity requirements for human telomere protein interaction with telomerase holoenzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34455–34464, 2012.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Telomerase activity in human cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 8, n. 1, p. 66–71, 1996.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 6, p. 349–353, 2011.

SHEN, M. et al. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 73, n. 2, p. 133–137, 2011.

SHI, J. et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 482–486, 2014.

SHTIVELMAN, E. et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1392–1433, 2014.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10–29, 2012 .

SIERON, P. et al. DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1410–1416, 2009.

SODER, A. I. et al. Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. **Oncogene**, v. 16, n. 8, p. 979–983, 1998.

SOOHOO, C. Y. et al. Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to prevent telomere elongation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3894–3906, 2011.

SPYROPOULOU, A. et al. Role of histone lysine methyltransferases SUV39H1 and SETDB1 in gliomagenesis: modulation of cell proliferation, migration, and colony formation. **Neuromolecular Medicine**, v. 16, n. 1, p. 70–82, 2014.

SREEDHAR, A. S. et al. **Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance**FEBS Letters, 2004.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World cancer report 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014. p. 1–2.

SUN, B. et al. Telomere length variation: a potential new telomere biomarker for lung cancer risk. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 88, n. 3, p. 297–303, 2015.

SUNAMI, Y. et al. The role of telomeres in liver disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 125, p. 159-172, 2014.

TAGA, S. et al. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. **Annals of Surgery**, v. 230, n. 5, p. 715–720, 1999.

SYNOWIEC, E. et al. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. **Mutation Research**, v. 648, p. 65–72, 2008.

TAKAGI, S. et al. Telomere shortening and the clinicopathologic characteristics of human colorectal carcinomas. **Cancer**, v. 86, n. 8, p. 1431–1436, 1999.

TAKENAKA, T. et al. Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 895–900, 2007.

TARGOWSKI, T. et al. Telomerase activity in transthoracic fine-needle biopsy aspirates from non-small cell lung cancer as prognostic factor of patients' survival. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 61, n. 1, p. 97–103, 2008.

THUN, M. J. et al. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e185, 2008.

TOMÁS-LOBA, A. et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 609–622, 2008.

TONG, A. S. et al. ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. **Cell Reports**, v. 13, n. 8, p. 1633–1646, 2015.

TSAO, A. S. **Lung Carcinoma - Pulmonary Disorders - MSD Manual Professional Edition**. Disponível em: <<http://www.msdmanuals.com/professional/pulmonary-disorders/tumors-of-the-lungs/lung-carcinoma>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

ULANER, G. A. et al. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. **Cancer Research**, v. 58, n. 18, p. 4168–4172, 1998.

URIBARRI, M. et al. A new biomarker panel in bronchoalveolar lavage for an improved lung cancer diagnosis. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 9, n. 10, p. 1504–1512, 2014.

VAZIRI, H. et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 4, p. 661–667, 1993.

VELMURUGAN, B. K. et al. Excavatolide B inhibits nonsmall cell lung cancer proliferation by altering peroxisome proliferator activated receptor gamma expression and PTEN/AKT/NF-K β expression. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 290–301, 2017.

VENTEICHER, A. S. et al. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 945–957, 2008.

VERDUN, R. E.; KARLSEDER, J. Replication and protection of telomeres. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 924–931, 2007.

VILLALOBOS, P.; WISTUBA, I. I. Lung cancer biomarkers. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 13–29, 2017.

WANG, Q. et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. **Cancer Detection and Prevention**, v. 29, n. 6, p. 544–551, 2005.

WATSON, J. D. Origin of concatemeric T7DNA. **Nature**, v. 239, n. 94, p. 197–201, 1972.

WEI, R.; DEVILBISS, F. T.; LIU, W. Genetic polymorphism, telomere biology and non-small lung cancer risk. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, n. 10, p. 549–561, 2015.

WITKOWSKA, A. et al. Expression profile of significant immortalization genes in colon cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 25, n. 3, p. 321–329, 2010.

WRIGHT, W. E.; PEREIRA-SMITH, O. M.; SHAY, J. W. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 7, p. 3088–3092, 1989.

WOLD, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 61–92, 1997.

WU, T.-C. et al. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. **Lung Cancer (Amsterdam)**, v. 41, n. 2, p. 163–169, 2003a.

WU, X. et al. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 16, p. 1211–1218, 2003b.

WU, X. et al. Identification of crucial regulatory relationships between long non-coding RNAs and protein-coding genes in lung squamous cell carcinoma. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 3, p. 146–152, 2016.

YOKOI, S. et al. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 13, p. 4705–4713, 2003.

YUAN, X. S. et al. Downregulation of RUVBL1 inhibits proliferation of lung adenocarcinoma cells by G1/S phase cell cycle arrest via multiple mechanisms. **Tumor Biology**, v. 37, n. 12, p. 16015–16027, 2016.

ZHANG, D. K. et al. Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 154–160, 1999.

ZHANG, H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: its role in tumorigenesis and aging. **Journal of Cellular Physiology**, v. 210, n. 3, p. 567–574, 2007.

ZHANG, W.; XU, J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker Research**, v. 5, n. 1, p. 1, 2017.

ZHANG, X. et al. Cytoplasmic expression of pontin in renal cell carcinoma correlates with tumor invasion, metastasis and patients' survival. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

ZHONG, F. L. et al. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 481–494, 2012.

ZHU, X. D. et al. ERCC1/XPF Removes the 3' Overhang from Uncapped Telomeres and Represses Formation of Telomeric DNA-Containing Double Minute Chromosomes. **Molecular Cell**, v. 12, n. 6, p. 1489–1498, 2003

ZHU, C.-Q. et al. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 10, p. 1452–1459, 2006.

ZHU, C.-Q. et al. Prognostic gene expression signature for squamous cell carcinoma of lung. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 17, p. 5038–5048, 2010.