

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 identificada 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,  $\leq 0.05$ , 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 (log10) em tumor vs normal _____	46
Figura 7 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) dos RNAs teloméricos não codantes em tumor vs normal _____	56
Figura 8 - Gráficos representativos da expressão relativa (log10) dos genes teloméricos nos diferentes grupos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC _____	60
Figura 9 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) 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

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>1.1 Características biológicas e genéticas do câncer</b> .....	14
<b>1.2 Câncer de Pulmão</b> .....	15
1.2.1 Alterações genéticas e moleculares em NSCLC .....	15
<b>1.3 Telômeros e Características Gerais</b> .....	19
<b>1.4 Telômeros e câncer</b> .....	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
<b>2 OBJETIVO GERAL DA PROPOSTA</b> .....	33
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1 Dados das amostras</b> .....	34
<b>3.2 Metodologia de extração de RNA</b> .....	35
<b>3.3 Metodologia de extração de DNA</b> .....	35
<b>3.4 Metodologia de validação de alterações na expressão de genes associados a maquinaria telomérica: PCR quantitativa em tempo real</b> .....	35
<b>3.5 Análises estatísticas dos dados (RT-qPCR)</b> .....	37
<b>3.6. Análise bioinformática dos dados de RNA-Seq</b> .....	38
<b>3.7. Metodologia para medir o perfil de restrição do comprimento telomérico (Southern blot telomérico)</b> .....	39
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>5.1 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC</b> .....	42
5.1.1 Investigação de alterações na expressão de RNAs teloméricos não codantes em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC .....	54
<b>5.2 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas nos subtipos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC</b> .....	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
<b>5.3</b>	<b>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.....</b>	<b>71</b>
<b>5.4</b>	<b>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.....</b>	<b>71</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA) .....</b>	<b>75</b>
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
<b>5.6</b>	<b>Análise do perfil de restrição telomérico em amostras de pacientes diagnosticados com NSCLC .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>922</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 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).

## 1.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é líder em mortalidade por câncer no mundo, sendo que o número de óbitos ultrapassa aquele dos cânceres de mama, cólon e próstata, combinados. De acordo com a OMS, o carcinoma pulmonar causa mais de 1,6 milhões de óbitos por ano no mundo e apresenta um aumento de 2% por ano em sua incidência mundial (JEMAL et al., 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012; “WHO | Cancer”, 2017). Esses dados indicam que os carcinomas pulmonares continuarão a representar um importante problema de saúde pública mundial. O tabagismo é o principal fator de risco (aproximadamente 85% dos casos) para o desenvolvimento de câncer de pulmão (THUN et al., 2008; LONGO et al., 2011; “Lung Carcinoma - Pulmonary Disorders - MSD Manual Professional Edition”, 2016). Fatores ambientais como exposição ao amianto, gás radônio e poluição do ar também são reconhecidos fatores de risco.

Os carcinomas pulmonares são classificados em dois tipos principais: células não pequenas (*Non-Small Cell Lung Carcinoma* - NSCLC) que compreende aproximadamente 85% dos casos e células pequenas (*Small Cell Lung Cancer* - SCLC), representando aproximadamente 15% dos casos. Os tipos NSCLC e SCLC são diferentes molecularmente, contendo várias alterações genéticas associadas aos subtipos específicos e outras comuns aos dois subtipos, entretanto, observadas em diferentes frequências. O NSCLC pode ser dividido histologicamente em três subtipos principais: adenocarcinoma (*Lung Adenocarcinoma*- LUAD), carcinoma de células escamosas (*Lung Squamous Cell Carcinoma*- LUSC) e carcinoma de células grandes (*Large-Cell Carcinoma*- LCC). O subtipo histológico LUAD é o mais comum (aproximadamente 40% dos casos) (BREATHNACH et al., 2001; SHTIVELMAN et al., 2014).

### 1.2.1 Alterações genéticas e moleculares em NSCLC

A ativação de oncogenes ocorre na grande maioria, senão em todos os tumores do tipo NSCLC. As principais alterações observadas são mutações, ampliações gênicas ou rearranjos de DNA, as quais levam à ativação e aumento da expressão de oncogenes. Oncogenes comumente ativos em NSCLC, do subtipo histológico LUAD, compreendem mutações nos genes *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), *ERBB2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), *MYC* (*myelocytomatosis oncogene*), *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *MET* (*mesenchymal-epithelial transition factor*), *CCND1* (*cyclin D1*), *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*), fusão *EML4-ALK* (*echinoderm*

*microtubule associated protein like 4 – anaplastic lymphoma kinase*) e *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*). Mutações em *KRAS* são encontradas em aproximadamente 20% dos casos de LUAD (LARSEN; MINNA, 2011).

A perda da função de genes supressores tumorais é também um importante fator que culmina no desenvolvimento do câncer de pulmão. Supressores tumorais comumente inativados são: *TP53* (*Tumor Protein P53*), *RBI* (*Retinoblastoma 1*), *STK11* (*Serine/threonine kinase 11*), *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *FHIT* (*fragile histidine triad*), *RASSF1A* (*Ras-association domain family 1, isoform A*) e *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) (LARSEN; MINNA, 2011). *TP53* (17p13) é um importante supressor tumoral, mutações somáticas nesse gene ocorrem em cerca de 50% dos casos de NSCLC (LARSEN; MINNA, 2011; SHTIVELMAN et al., 2014). A Tabela 1 contém a lista das principais vias moleculares e genes envolvidos nos subtipos de cânceres de pulmão.

**Tabela 1 - Vias celulares que possuem a atividade afetada por alterações somáticas em pacientes com câncer de pulmão**

VIAS	LUAD		LUSC		SCLC	
	%	Genes envolvidos	%	Genes envolvidos	%	Genes envolvidos
<b>RTK</b>	50%	<i>EGFR, ALK, MET, ERBB2, ROS, RET</i>	27%	<i>EGFR, FGFR1-3, ERBB2, ERBB3, DDR2</i>	6%	<i>FGR1</i>
<b>RAS/RAF</b>	25%	<i>KRAS, NF1, BRAF, NRAS</i>	22%	<i>NF1, KRAS, HRAS, NRAS, RASA1, BRAF</i>		
<b>PI3K/AKT</b>	10-12%	<i>PIK3CA, PTEN, AKT1</i>	59%	<i>PIK3CA, PTEN, AKT1, AKT2, AKT3, TSC1-2</i>	10%	<i>PTEN</i>
<b>LKB1/AMPK</b>	15-30%	<i>LKB1</i>				
<b>TP53</b>	50%	<i>P53, MDM2</i>	80%	<i>TP53</i>	80-90%	<i>TP53</i>
<b>RB1/CDKNA2</b>	15-20%	<i>CDKNA2</i>	79%	<i>CDKNA2, RB1</i>	100%	<i>RB1, CCNE1</i>
<b>MYC</b>	30%	<i>MYC</i>			16-30%	<i>MYC, MYCN, MYCL</i>
<b>Regulação epigenética</b>	22%	<i>SMARCA4, ARID1A, SETD2</i>	20%	<i>MLL2</i>	19%	<i>EP300, CREBBP, MLL</i>
<b>Via de desenvolvimento</b>	20%	<i>NKX2.1/TTF1</i>	44%	<i>SOX2, TP63, NOTCH1, NOTCH2, ASCL4, FOXP1</i>	20%	<i>SLIT2, EPHA7</i>
<b>Resposta ao estresse oxidativo</b>	10%	<i>KEAP1</i>	34%	<i>KEAP1, NRF2, CUL3</i>		

Nota: Os genes envolvidos em cada tipo de câncer de pulmão são listados na ordem de frequência de alterações encontradas. **AKT1-3:** *AKT serine/threonine kinase 1-3*, **ALK:** *anaplastic lymphoma kinase*, **ARID1A:** *AT-rich interaction domain 1A*, **ASCL4:** *achaete-scute family bHLH transcription factor 4*, **BRAF:** *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*, **CCNE1:** *cyclin E1*, **CDKNA2:** *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*, **CREBBP:** *CREB binding protein*, **CUL3:** *cullin 3*, **DDR2:** *discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*, **EGFR:** *epidermal growth factor receptor*, **EP300:** *E1A binding protein p300*, **EPHA7:** *EPH receptor A7*, **ERBB2-3:** *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2-3*, **FGFR1-3:** *fibroblast growth factor receptor 1-3*, **FOXP1:** *forkhead box P1*, **HRAS:** *HRas proto-oncogene, GTPase*, **KEAP1:** *kelch like ECH associated protein* **KRAS:** *KRAS proto-oncogene, GTPase*, **LKB1 (STK11):** *serine/threonine kinase 11*, **LKB1/MPK:** *serine/threonine kinase 11/protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1*, **LUAD:** *Lung Adenocarcinoma*, **LUSC:** *Lung Squamous Cell Carcinoma*, **MDM2:** *MDM2 proto-oncogene*, **MET:** *mesenchymal-epithelial transition factor*, **MLL:** *KMT2A lysine methyltransferase 2A*, **MLL2:** *lysine methyltransferase 2D*, **MYC:** *myelocytomatosis oncogene*, **MYCL:** *MYCL proto-oncogene, bHLH transcription factor*, **MYCN:** *MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor*, **NF1:** *neurofibromin 1*, **NKX2.1/TTF1 NK2:** *homeobox 1 /transcription termination factor 1*, **NOTCH1:** *notch 1*, **NRAS:** *NRas proto-oncogene, GTPase*, **NRF2:** *nuclear factor, erythroid 2 like 2*, **PI3K/AKT:** *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic/ AKT serine/threonine kinase*, **PIK3CA:** *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, **PTEN:** *phosphatase and tensin homolog*, **RAS/RAF:** *Ras proto-oncogene, GTPase/Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*, **Raf-1:** *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*, **RASA1:** *RAS p21 protein activator 1*, **RB1:** *Retinoblastoma 1*, **RB1/CDKNA2:** *Retinoblastoma 1/cyclin dependent kinase inhibitor 2A*, **RET:** *Ret proto-oncogene*, **ROS:** *c-ros gene*, **RTK:** *receptor tyrosine kinases*, **SCLC:** *Small Cell Lung Cancer*, **SETD2:** *SET domain containing 2*, **SLIT2:** *slit guidance ligand 2*, **SMARCA4:** *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*, **SOX2:** *SRY (sex determining region Y)-box 2*, **TP53:** *tumor protein p53*, **TP63:** *tumor protein p63*, **TSC1-2:** *TSC complex subunit 1-2*. Tabela retirada e modificada de Shtivelman et al. (2014).

Mutações em *EGFR* e fusões envolvendo *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) e outros receptores de tirosina-quinases (*receptor tyrosine kinases- RTKs*) tem sido associadas ao desenvolvimento de LUAD. Entre outros genes alterados em LUAD, estão *KRAS*, *BRAF* (*B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*), *ERBB2*, *PI3KC* (*phosphoinositide 3-kinase, catalytic*) e translocações envolvendo *RET* (*Ret proto-oncogene*) e *ROS* (*c-ros gene*), assim como *RTK/MET*, ativado principalmente em tumores que desenvolvem resistência a terapias direcionadas. Os tumores do subtipo LUSC raramente têm mutações em *EGFR* ou fusões *ALK*, ao invés, apresentam alterações em outros *RTKs*. Por exemplo mutações em *DDR2* (*discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*) e ampliações/mutações em *FGFR* (*fibroblast growth factor receptor*) (SHTIVELMAN et al., 2014).

Um estudo abrangente utilizando sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing- NGS*) foi realizado, em 2012, na tentativa de identificar mutações e alterações em LUAD. Para tanto, foram analisados o genoma e o exoma de 183 amostras, os quais apresentaram taxa média de 12 mutações somáticas exônicas por megabase (Mb). Entretanto foram encontradas diferenças em tumores de não fumantes (média de 2,9 mutações por Mb) e fumantes (12,9 mutações por Mb). Adicionalmente, foi observado um grande número de mutações que envolviam desregulação epigenética ou alterações na expressão do transcrito codificador (IMIELINSKI et al., 2012; SHTIVELMAN et al., 2014).

Outro estudo utilizando sequenciamento de alto desempenho analisou 178 carcinomas pulmonares (LUSC) e identificou uma média de 360 mutações exônicas, 323 alterações de número de cópias, 165 rearranjos genômicos e uma taxa média de 8,1 mutações somáticas de por Mb. Em geral o espectro de alterações somáticas em LUSC foi similar a LUAD, com exceção de amplificação genômica em 3q. Portanto, nesse estudo foi encontrada uma alteração molecular específica em LUSC, caracterizada pela amplificação do gene *SOX2* (*SRY sex determining region Y-box 2*), mutações em *NFE2L2* (*nuclear factor, erythroid 2 like 2*) e *KEAP1* (*kelch like ECH associated protein 1*), alterações na via *PI3K* (*phosphatidylinositol 3-kinase*), amplificação de *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*), e mutações de *DDR2* que não são encontradas ou são relativamente raras em LUAD (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH N, 2012; SHTIVELMAN et al., 2014).

### 1.3 Telômeros e Características Gerais

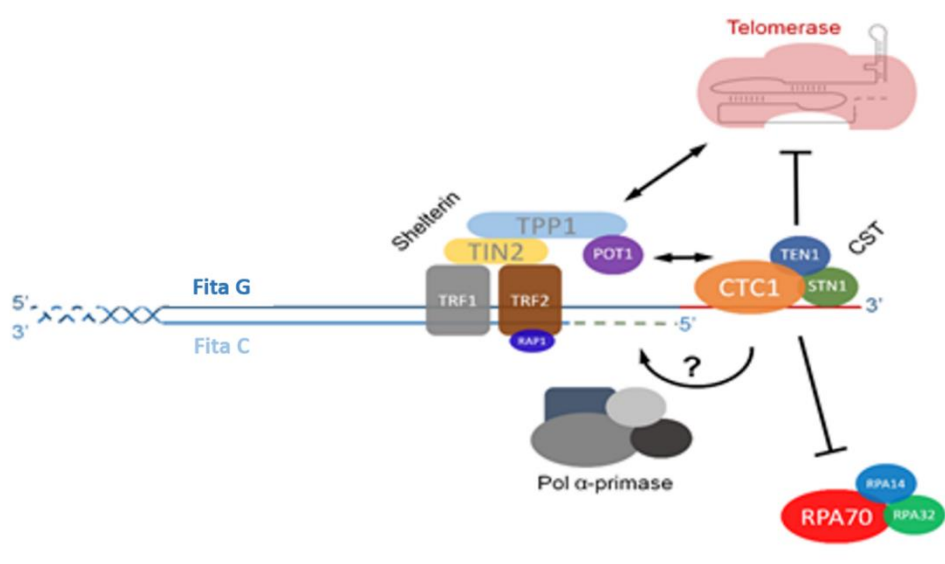
Telômeros são complexos nucleoprotéicos localizados nas extremidades dos cromossomos eucarióticos (CHAN; BLACKBURN, 2004). São responsáveis pela estabilidade genômica, pois impedem que os terminais cromossômicos sejam reconhecidos, pela maquinaria de reparo do DNA, como quebras de DNA na forma de dupla fita e evitam a fusão dos terminais (CELLI; DE LANGE, 2005; VERDUN; KARLSEDER, 2007). Consistem de repetições conservadas e não codantes do tipo: 5'-TTAGGG-3' (exemplo em humanos) (MOYZIS et al., 1988), cuja extensão varia de centenas a milhares de pares de base. Em humanos o tamanho dos telômeros varia de 5.000 a 15.000 pares de base (LIU et al., 2002; AVIV; LEVY; MANGEL, 2003).

O DNA telomérico é constituído de uma região dupla fita e outra simples fita, sendo uma fita rica em guaninas (fita-G) e a outra rica em citosina (fita-C). A fita rica em G, forma uma protrusão de fita simples na extremidade 3' nomeada "3' G-overhang", que se associa a proteínas que regulam a atividade da telomerase, enzima responsável pela replicação dos telômeros (COLLINS, 2006). Os telômeros podem assumir diferentes conformações como a de *t-loop* (invasão da fita simples rica em G, na fita dupla, formando uma estrutura semelhante à de um laço) ou G-quadruplexes, na qual as guaninas da fita simples rica em G interagem formando uma estrutura de quarteto (G4 DNA). Tanto o *t-loop* quanto o G-quadruplex são mantidos por ação de proteínas da maquinaria telomérica e tem função de proteção ao telômero, evitando a ação da maquinaria de reparo, e de controle do acesso da telomerase ao DNA telomérico (GILSON; GÉLI, 2007).

Na maioria dos eucariotos os telômeros são mantidos por ação da telomerase, uma ribonucleoproteína (RNP) com função de transcriptase reversa especializada, composta por dois principais componentes: a proteína telomerase transcriptase reversa (TERT) e o RNA não codificador (conhecido como TERC, "*telomerase RNA component*"), que é parte essencial da enzima. TERC é um RNA longo não codificador que contém uma pequena sequência que serve como molde para a telomerase replicar os telômeros (GILSON; GÉLI, 2007; LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012). O complexo mínimo formado por TERT e TERC é suficiente para a replicação telomérica "*in vitro*", contudo "*in vivo*" o complexo ribonucleoproteico da telomerase necessita da ação de proteínas reguladoras essenciais para a manutenção telomérica (GILSON; GÉLI, 2007; LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012).

Nos telômeros de mamíferos estão associadas proteínas que formam um complexo multiprotéico denominado de *shelterin* composto pelas proteínas TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*), TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*), TIN2 (*TRF1-interacting protein 2*), POT1 (*protection of telomeres protein 1*), TPP1 (*TIN2- and POT1-interacting protein*) e RAP1 (*repressor/ activator protein 1*) (DE LANGE, 2005; MARTÍNEZ; BLASCO, 2010, 2011), as quais exercem um papel fundamental na proteção e manutenção do tamanho dos telômeros (LIU et al., 2004; DE LANGE, 2005). As proteínas TPP1 e POT1 são fundamentais no processo pois formam um complexo com o DNA telomérico via TIN2 e TRF1/2 que regula o acesso da telomerase aos telômeros. Essa regulação parece estar diretamente associada a interação de TPP1 com outro complexo importante para a manutenção telomérica, o complexo CST. Ele é composto pelas proteínas CTC1 (*CST telomere replication complex component 1*), STN1 (*STN1, CST complex subunit*) e TEN1 (*TEN1, CST complex subunit*) em humanos, as quais são estruturalmente semelhantes ao complexo heterotrimérico RPA (*Replication Protein A*). Junto ao complexo *shelterin*, as proteínas do complexo CST são responsáveis pela manutenção e estabilidade telomérica (Figura 1) (GIARDINI et al., 2014).

**Figura 1 - Estrutura telomérica e ação conjunta dos complexos *shelterin* e CST na manutenção telomérica**



Nota: Nos terminais dos cromossomos, a telomerase pode ser recrutada pela interação com TPP1/POT1. A alongação telomérica é finalizada pela telomerase quando o complexo CST se liga ao 3' *G-overhang* recém-sintetizado. O complexo CST também interage com a DNA pol $\alpha$ -primase para promover a síntese da fita C (linha pontilhada). O complexo CST inibe o acesso da RPA aos telômeros pela sua alta afinidade com DNA de simples fita rico em G evitando que os telômeros sejam confundidos com DNA danificado pela maquinaria de reparo. Figura retirada de GIARDINI et al. (2014).

No entanto, a função do complexo *shelterin* pode ser comprometida, ou até mesmo perdida, em células pré-senescentes que atingem comprimentos teloméricos criticamente curtos ou quando ocorrem alterações genéticas em seus componentes, o que resulta em desproteção telomérica e ativação de mecanismos de reparo ao DNA, podendo culminar em apoptose celular, senescência ou instabilidade genômica. Os telômeros ficam expostos a sinais de reparo ao DNA como as vias das quinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM- and Rad3-related*), e ação de mecanismos de reparo como: junção de pontas não homólogas (c-NHEJ, *classical non-homologous end joining* e alt-NHEJ, *alternative non-homologous end joining*) e recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*) (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

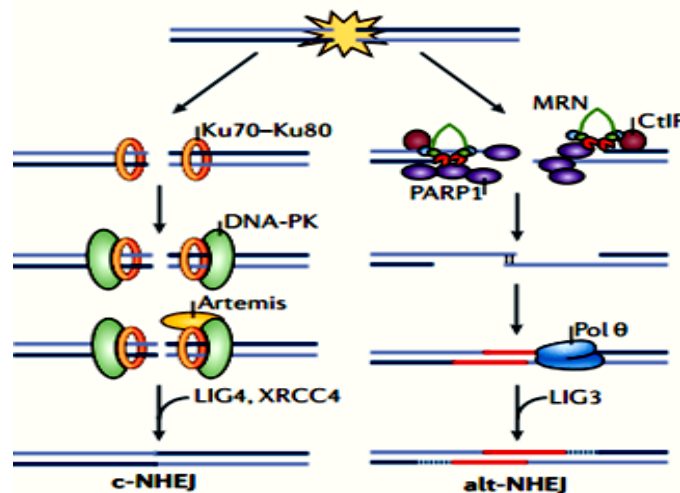
Geralmente, as células detectam quebras no DNA pela ação de duas vias moleculares, conduzidas pelas quinases de sinalização ATM e ATR, que são ativadas em resposta a formação de quebras de fita dupla de DNA (DSBs- *double-strand breaks*) e quebras de fita única do DNA, respectivamente. Sinais de reparo disparam a parada do ciclo celular, que permite que as células reparem suas quebras ou entrem em senescência ou apoptose (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). Há pouco tempo, mostrou-se que as vias de ATM e ATR também estão relacionadas com a regulação da telomerase. Uma via envolvendo ATM e ATR é mediada pela fosforilação do componente *shelterin* TRF1 resultando na sua remoção dos telômeros e na estagnação da forquilha de replicação nessa região e recrutamento da telomerase. Uma segunda via envolve ATM e ATR facilitando a montagem da telomerase. Esses dados revelam que os telômeros também estão envolvidos com a habilidade de explorar aspectos de vias de sinalização de danos ao DNA para regular a presença da telomerase nos telômeros. Maior compreensão da regulação da montagem da telomerase e acesso desta aos telômeros podem fornecer informações valiosas no processo de desenvolvimento de terapias mais precisas para pacientes com câncer (TONG et al., 2015).

O reparo de quebras de DNA dupla fita nos telômeros pode envolver vias de recombinação homóloga ou não homóloga. O mecanismo de recombinação não homóloga ocorre ou pela via clássica c-NHEJ ou pela via alternativa alt-NHEJ. C-NHEJ promove pequenas alterações de sequências nas junções onde ocorre o reparo, enquanto que a via alt-NHEJ provoca deleções e/ou inserções nas regiões de reparo. C-NHEJ é ativada ao longo do ciclo celular, quando o heterodímero Ku70- Ku80 se liga as pontas quebradas de DNA, Ku então recruta a DNA-PKcs quinases (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) que promovem a fosforilação nas enzimas: Artemis (*terminal*

*end-processing enzyme*) responsável pela clivagem das protruções de fita simples, DNA ligase 4 e da proteína XRCC4 (*X-ray repair cross complementing 4*) que catalisa a junção das pontas de DNA (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016), mecanismo representado na Figura 2.

A via alt-NHEJ, atua, principalmente, nas fases S e G1 do ciclo celular, é dependente do sinal da PARP1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*) e da ressecção da fita de DNA 5'–3' pelo complexo MRN (MRE11–RAD50–NBS1) e pela proteína: CtIP (*CtBP-interacting protein*). Durante o reparo ocorre um pareamento de bases nas pontas quebradas, conduzindo a junção das extremidades opostas de DSBs. O anelamento das pontas são substrato para a síntese de DNA pela Pol  $\theta$  (*Polimerase  $\theta$* ), permitindo a junção das pontas de DNA, pela LIG3 (*ligase 3*) (Figura 2) (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

**Figura 2 - Mecanismos de reparo a danos no DNA por junção de pontas não homólogas**



Nota: A via C-NHEJ é ativada pela ação do complexo Ku70/80 que recruta a quinase DNA-PKcs que promove fosforilação nas enzimas: Artemis responsável pela clivagem das protruções de fita simples, DNA ligase 4 e da proteína XRCC4 que catalisa a junção das pontas de DNA. A via alt-NHEJ é dependente do sinal da PARP1 e da ressecção da fita de DNA 5'–3' pelo complexo MRN (MRE11–RAD50–NBS1) e pela proteína CtIP. Ocorre um pareamento de bases nas pontas quebradas, conduzindo a junção das extremidades opostas de DSBs. O anelamento das pontas é substrato para a síntese de DNA pela Pol  $\theta$ , permitindo a junção das pontas de DNA, pela LIG3. Figura retirada de Lazzerini-Denchi e Sfeir (2016).

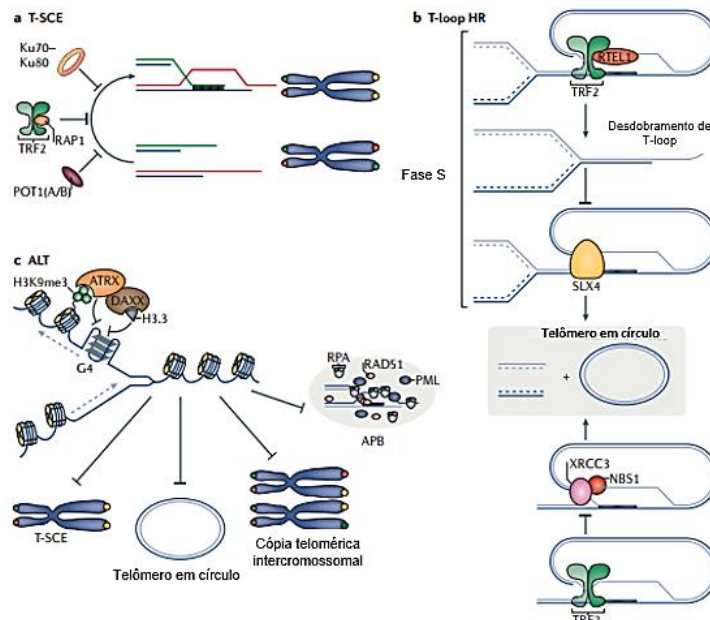
O reparo por recombinação homóloga nos telômeros ocorre de três formas: troca de fragmentos entre cromátides irmãs (*telomere sister chromatid exchange T-SCE*), recombinação homóloga de *t-loop* (*telomere loop*) e alongamento alternativo dos telômeros (*alternative lengthening of telomeres - ALT*) – Figura 3 (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

Mecanismos T-SCE podem ser danosos quando provocam trocas desiguais entre cromátides irmãs, gerando células filhas com telômeros criticamente curtos. Componentes shelterin e o complexo Ku atuam inibindo essa via. Por exemplo, POT1 neutraliza a ação de fatores de recombinação homóloga (RPA e subsequentemente RAD51 recombinase). RAP1 e TRF2 estabilizam a junção do DNA telomérico simples e dupla fita, bloqueando a recombinação (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

A configuração *t-loop* dos telômeros precisa ser desfeita para que ocorra replicação, caso contrário essa estrutura pode sofrer excisão por meio de recombinação homóloga, envolvendo a ação das proteínas de reparo: XRCC3 (*X-ray repair cross complementing 3*), NBS1 (*Nibirin*) e SLX4 (*SLX4 structure-specific endonuclease subunit*). TRF2, promove a formação de *t-loop* e protege essa estrutura de sofrer recombinação homóloga aberrante, recrutando RTEL1 (*regulator of telomere elongation helicase 1*) para desmanchar a conformação *t-loop* na fase S do ciclo celular. Deleção de RTEL1 ou inibição da interação dessa proteína com TRF2 permite que SLX4 atue para a excisão de *t-loop*, resultando na formação de círculos dupla fita de DNA telomérico (*t-circles*) e rápida perda telomérica. TRF2 também protege a estrutura *t-loop* da clivagem de XRCC3 e NBS1 (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

O mecanismo de alongamento alternativo dos telômeros, ALT, ocorre em um subconjunto de tumores (10-15%) que não possuem atividade da telomerase. A recombinação ocorre entre telômeros de diferentes cromossomos, levando ao aparecimento de telômeros altamente heterogêneos em comprimento e com repetições não-canônicas, devido a ocorrência de recombinação entre regiões subteloiméricas. Telômeros ALT são associados aos corpos ALT (*associated promyelocytic leukemia nuclear bodies* -APBs), tem expressão aumentada do *lncTERRA* (*Telomere Repeat containing RNA*) e elevados níveis de recombinações T-SCE com atuação de fatores da maquinaria de recombinação homóloga: RAD51, MRN, RAD9, RAD17, RPA e outros. Porém, os motivos e fatores que desencadeiam esse mecanismo alternativo permanecem desconhecidos. A chaperona ATRX (*ATRX, chromatin remodeler*) pode ter um papel chave nesse processo, pois é encontrada mutada na maioria das células e tumores ALT, e a reintrodução de ATRX em células ALT suprime a formação de T-SCE, APBs, *c-circles* e a recombinação inter-cromossômica telomérica (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016).

**Figura 3 - Os três tipos de reparo por recombinação homóloga nos telômeros**



Nota: A) Mecanismo T-SCE: trocas de fragmentos teloméricos entre cromátides irmãs é inibida por RAP1, POT1 e o complexo Ku70-Ku80. B) Recombinação homóloga envolvendo a conformação *t-loop* é bloqueada pela ação de TRF2, que recruta RTEL1 para desfazer a conformação *t-loop*, protegendo os telômeros da clivagem de SLX4. Em adição, TRF2 protege os telômeros com conformação *t-loop* de sofrerem recombinação homóloga aberrante, inibindo a ação de XRCC3 e NBS1. C) Telômeros formam a estrutura estável G4 quadruplex, que impedem a progressão da forquilha de replicação. ATRX desmancha essa conformação permitindo a deposição da histona H3.3, e auxiliando na progressão da replicação. A atividade de ATRX nos telômeros inibe as características de ALT: T-SCEs, formação de telômeros em círculos, recombinação intercromossomal e formação de APBs. Figura retirada de Lazzarini-Denchi e Sfeir (2016).

O envolvimento de uma nova via no controle dos telômeros foi proposta, esta é feita por longos RNAs não codificadores transcritos a partir das regiões subtelomérica/telomérica. Em humanos, os RNAs conhecidos como *Telomere Repeat containing RNA*, TERRA (AZZALIN et al., 2007), são transcritos pela RNAPII (*RNA polimerase II*) a partir da região subtelomérica da fita telomérica rica em C, seguido de repetições teloméricas que seguem em direção ao término do cromossomo (AZZALIN et al., 2007; SCHOEFTNER; BLASCO, 2008; NERGADZE et al., 2009; PFEIFFER; LINGNER, 2012). Ainda não está bem definido o que regula o número de transcritos TERRA nas células. E no caso de células tumorais depende da fase de desenvolvimento do tumor e também da estrutura da cromatina telomérica (ARORA; BRUN; AZZALIN, 2012). O que já é bem reconhecido é que o TERRA está envolvido na regulação do comprimento e replicação do telômero, pela modulação das ações da exonuclease 1 e da telomerase, resposta a danos no DNA telomérico e mudanças na composição da cromatina telomérica durante o ciclo celular.

#### 1.4 Telômeros e câncer

A desproteção telomérica pode ser desastrosa para a sobrevivência da célula, gerando instabilidade genômica (CESARE et al., 2013) que pode acarretar no desenvolvimento de doenças em mamíferos (JACOBS, 2013). Desta forma, a pesquisa com telômeros tem despertado grande interesse em áreas como desenvolvimento, senescência celular e câncer (ZHANG, 2007).

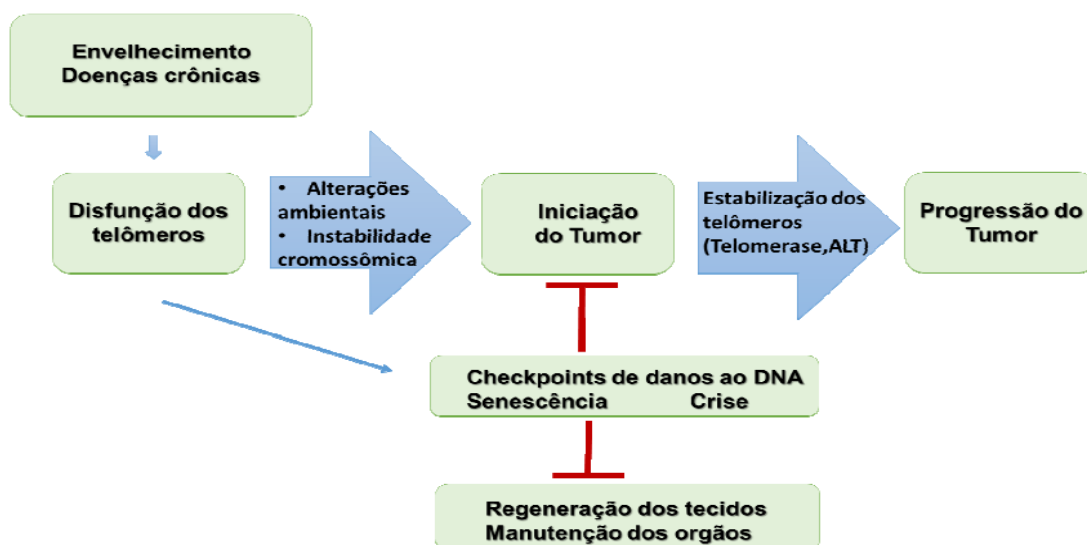
Devido à importância da telomerase na manutenção da integridade dos telômeros, sua atividade é extensamente regulada em alguns organismos, principalmente em mamíferos nos quais a atividade desta enzima é muito baixa ou indetectável em células somáticas (ULANER et al., 1998; DOJOSUBROTO et al., 2003; BLASCO, 2005; SCHAETZLEIN; RUDOLPH, 2005). A telomerase é expressa somente durante o início da embriogênese e sua atividade é largamente reprimida a partir do período neonatal, exceto em células germinativas e em órgãos altamente proliferativos como a pele, fígado, intestino e medula óssea que contêm subpopulações de células tronco/progenitoras (HIYAMA et al., 1995; CHIU et al., 1996; HÄRLE-BACHOR; BOUKAMP, 1996; ULANER et al., 1998; SAVAGE, 2014).

Em células somáticas humanas, durante cada divisão celular, os telômeros encurtam devido à incompleta replicação dos terminais de cromossomos pela DNA polimerase e também pela inibição da atividade da telomerase nessas células (WATSON, 1972; OLOVNIKOV, 1973; AUBERT; LANSDORP, 2008). Quando os telômeros tornam-se criticamente pequenos, uma resposta celular é desencadeada sinalizando para a interrupção do ciclo celular e entrada em senescência, indicando que as células alcançaram a máxima capacidade de proliferação (limite de *Hayflick*) (HAYFLICK, 1965). Em humanos, as células que conseguem escapar dessa crise natural já perderam a função de genes que são *checkpoints* críticos do ciclo celular tais como: *TP53*, *p16INK4a* (*cyclin-dependent kinase-4 inhibitor*) e *pRB* (*RB transcriptional corepressor 1*) e da maquinaria de reparo a danos no DNA (WRIGHT; PEREIRA-SMITH; SHAY, 1989). Essas células acumularam mutações e múltiplas anormalidades cromossômicas e conseguem reativar um mecanismo para a manutenção dos telômeros (ou pela reativação da telomerase que ocorre em 85-90% dos tumores, ou pelo mecanismo ALT, presente em 10-15% dos tumores telomerase negativos). Desta maneira, as células que escaparam dos processos de crise e senescência, considerados *checkpoints* para a supressão tumoral,

agora são consideradas imortais o que pode culminar com o processo de carcinogênese em humanos (KIM et al., 1994; MEYERSON et al., 1997; GIARDINI et al., 2014). A Figura 4 exemplifica o papel dos telômeros durante a carcinogênese.

A ativação da telomerase é a via mais comum para a imortalização e transformação celular. Sua expressão é detectada em aproximadamente 85-90% dos tumores malignos ( KIM et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esse fato confere a telomerase um alto potencial como biomarcador e alvo para o desenvolvimento de mecanismos baseados em diagnóstico, prognóstico e terapias para pacientes com câncer (SHAY; WRIGHT, 2011). O restante dos tumores apresenta o mecanismo alternativo para a manutenção telomérica, ALT (BRYAN et al., 1997).

**Figura 4 - Papel dos telômeros durante a carcinogênese**



Nota: Encurtamento dos telômeros em tecidos envelhecidos ou cronicamente danificados causa uma disfunção telomérica e aumenta o risco de início da tumorigênese. Para prevenir a ativação de mecanismos de “*checkpoints*” devido à presença de DNA danificado e para tornar-se imortalizada, células tumorais precisam estabilizar seus telômeros ou pela ativação da telomerase ou pelo mecanismo ALT. Figura retirada e modificada de Sunami et al. (2014).

Vários estudos mostram que a deleção genética ou a inibição da telomerase levam a uma significativa supressão da capacidade de formação tumoral e uma atenuação do crescimento de células neoplásicas em modelos *in vivo* (GONZÁLEZ-SUÁREZ et al., 2000; RUDOLPH et al., 2001; FARAZI et al., 2003; LECHEL et al., 2007). A inibição da telomerase usando camundongos *knockout* telomerase deficientes (-/-), contudo, mostrou atividade anti-tumoral somente depois de várias gerações quando estes apresentaram os telômeros com um tamanho crítico. Esse efeito anti-tumoral foi anulado

na ausência de expressão do gene supressor tumoral *TP53* (CHIN et al., 1999; GREENBERG et al., 1999).

Adicionalmente, pesquisas mostram que a expressão aumentada de *TERT* pode aumentar o tempo de vida desses animais, em casos que também há uma superexpressão de genes supressores tumorais, indicando que em mamíferos, *TERT* deve ter um papel antienvelhecimento (TOMÁS-LOBA et al., 2008).

#### 1.4.1 Câncer e o complexo *Shelterin*

O complexo proteico *shelterin* é a chave para a homeostase telomérica em mamíferos e outros vertebrados, orquestrando a ação da telomerase nos telômeros. Mutações em alguns componentes do complexo *shelterin* vêm sendo encontradas em várias doenças do envelhecimento, incluindo o câncer (ARMANIOS; BLACKBURN, 2012).

Variantes de *POT1* que prejudicam a proteção telomérica, aparecem associadas com melanoma familiar, glioma familiar e leucemia linfocítica crônica (RAMSAY et al., 2013; ROBLES-ESPINOZA et al., 2014; SHI et al., 2014; BAINBRIDGE et al., 2015; MARTÍNEZ; BLASCO, 2015). Todas as variantes de *POT1* que foram encontradas, conferem um efeito de alongamento aos telômeros, sugerindo que o alongamento em combinação com aberrações induzidas por essas mutações pode favorecer a incidência tumoral (MARTÍNEZ; BLASCO, 2015).

Ensaio com células tumorais humanas e células tronco embrionárias, têm demonstrado que o recrutamento da telomerase para os telômeros depende de uma região de superfície da proteína *TPP1*, região nomeada de *TEL patch* (para *TPP1 glutamate (E) and leucine (L)-rich patch*) (NANDAKUMAR et al., 2012; SEXTON; YOUMANS; COLLINS, 2012; ZHONG et al., 2012; SEXTON et al., 2014). Em um estudo no qual induziu-se mutações em *TEL patch* em células *Hela*, verificou-se que há uma redução da proliferação das células tumorais e a indução de morte celular (NAKASHIMA et al., 2013).

Outros estudos destacam a função de *TRF2*, como essencial para a proteção telomérica já que a inibição de *TRF2* pode induzir encurtamento telomérico (KARLSEDER et al., 1999; LECHER et al., 2005). Uma pesquisa recente demonstrou que a proteína *TRF1* também pode ser usada como alvo para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer. Nesse estudo foi demonstrado que a inibição de *TRF1*, reduz efetivamente o tamanho e o grau de malignidade de carcinoma de pulmão

em ratos deficientes para *p53* e *k-Ras*, com aumento da sobrevida do animal. Esse efeito de supressor tumoral de TRF1 ocorre já na primeira geração do animal e é independente do tamanho telomérico, sendo que a longo prazo não afeta a viabilidade e sobrevivência. Assim, telômeros desprotegidos pela inibição de TRF1, podem representar uma nova e potente estratégia terapêutica para tratar o câncer de pulmão induzido pela via do oncogene *k-Ras* (GARCÍA-BECCARIA et al., 2015).

#### 1.4.2 Câncer e proteínas teloméricas não *Shelterins*

A manutenção da arquitetura telomérica envolve uma rede altamente regulada de interação proteína-proteína, proteína-DNA e proteína-RNA, e o comprometimento dessa rede pode levar a disfunção telomérica e evolução celular para um estado maligno (O'SULLIVAN; KARLSEDER, 2010). Envolvidas nestes mecanismos estão as proteínas do complexo *shelterins* e as proteínas que não fazem parte desse complexo: como os fatores de reparo ao DNA MRE11/NBS1/RAD50 (complexo MNR) e proteínas de replicação RPA1 que previnem o telômero de sofrer degradação e facilitam a alongação telomérica (GILSON; GÉLI, 2007). Em adição, outros fatores são necessários para a correta atividade da telomerase, incluindo a proteína Disquerina (DKC1), componente do complexo telomerase e responsável por estabilizar a ligação de TERT/TERC (ALAWI; LIN, 2011). Mutações em *DKC1* estão relacionadas a disqueratose congênita (DC), doença caracterizada por múltiplas anormalidades na pele e medula óssea. Os pacientes com DC possuem telômeros excessivamente curtos e reduzida atividade de telomerase. Contudo, o gene *DKC1* não é encontrada mutado, mas sim com expressão elevada em cânceres esporádicos, porém a relação desse fato com o desenvolvimento tumoral permanece desconhecido (KIRWAN; DOKAL, 2008; MASON; BESSLER, 2011).

Em outro estudo, foram encontrados os genes *DKC1*, *RAD50*, *MRE11*, *NBS1* e *RPA1* com expressão elevada em células do plasma (células mononucleadas) de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM) em comparação com células de pacientes com Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), uma forma pré-maligna de MM (PANERO et al., 2015). Adicionalmente foi relacionado uma alta expressão de *TERT* com alta expressão de *DKC1* nas células de pacientes MM (PANERO et al., 2015). Já pesquisas que envolvem Leucemia Linfocítica Crônica mostram resultados controversos: um estudo encontrou altos níveis de expressão de *RPA1*, mas baixos níveis de *DKC1*, *MRE11* e *RAD50* (PONCET et al., 2008), porém outro observou alta expressão de

*MRE11*, *RAD50* e *RPA1* (HOXHA et al., 2014). Em adição, elevada expressão de *DKC1* foi detectada em diferentes tipos de tecido tumorais: carcinoma hepatocelular (LIU et al., 2012), próstata (SIERON et al., 2009), cólon (WITKOWSHA et al.; 2010) e mama (MONTANARO et al., 2008), sugerindo um papel crítico desse gene na tumorigênese (PANERO et al., 2015).

É sugerido que a alta expressão desses genes, ocorre em resultado do aumento da necessidade de reparo no DNA, contudo até o momento poucos estudos foram desenvolvidos nessa área (PANERO et al., 2015).

#### 1.4.3 Telômeros e câncer de pulmão

Os telômeros e proteínas associadas têm um papel fundamental no desenvolvimento do câncer, envolvendo principalmente a imortalização celular, o que torna essa estrutura um importante alvo para o delineamento de novas modalidades terapêuticas (SUN et al., 2015).

A atividade de telomerase em tecidos tumorais foi relatada em diferentes tipos de cânceres (NAKANO; WATNEY; MCDOUGALL, 1998; CHANG et al., 1999; TAKAGI et al., 1999; ZHANG et al., 1999). Ensaio como TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*), têm sido usados para avaliar a atividade da enzima em câncer de pulmão SCLC e na maioria dos NSCLC. Em relação aos NSCLC, a atividade de telomerase foi relatada em: 69-92% dos casos de LUAD, 60-91% de LUSC e 67-100% de LCC (CHANG et al., 1999; WEI; DEVILBISS; LIU, 2015). Outros estudos têm mostrado que além da atividade enzimática foi possível detectar aumento no nível de expressão de *TERT* em NSCLC (COUNTER et al., 1998; HSU et al., 2003; WU et al., 2003a; BRENNAN; HAINAUT; BOFFETTA, 2011; WEI; DEVILBISS; LIU, 2015). A inibição da telomerase tem sido proposta como alvo terapêutico em NSCLC (RUDEN; PURI, 2013), baseando-se no fato de que essa inibição levaria ao encurtamento telomérico, senescência ou apoptose das células em tecidos tumorais (SHAY; WRIGHT, 1996; OUELLETTE; WRIGHT; SHAY, 2011). Alguns desses estudos utilizam oligonucleotídeos antisensos que se ligam ao componente RNA da telomerase (OUELLETTE; WRIGHT; SHAY, 2011) tal como o *Imetelstat* (MOLCKOVSKY; SIU, 2008) e imunoterapia utilizando a vacina baseada em telomerase GV1001, a qual mostrou aumento de sobrevida de pacientes com NSCLC com doença avançada e não elegíveis para cirurgia, os quais receberam quimioterapia ou radioterapia como tratamento de primeira linha. Neste caso, a sobrevida foi somente observada em pacientes que desenvolveram células T de memória

com resposta específica a GV1001 e perfis de citocinas IFN $\gamma$  (alto)/IL-10 (baixo)/IL-4 (baixo) (SHTIVELMAN et al., 2014).

Estudos de associação genômica global (*Genome-Wide Association Studies-GWASs*) identificaram polimorfismos relacionados aos genes *TERT* e *CLPTMIL* (*cleft lip and palate transmembrane protein 1-like protein*), na região cromossômica 5p15.33, associados com o aumento do risco de câncer de pulmão. Entre eles estão os: polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) rs2736100 (associado ao aumento do risco de NSCLC mais alto em populações do leste asiático do que em caucasianos) e rs401681 e rs402710 (associados com risco de câncer de pulmão tanto em populações do leste asiático quanto em caucasianos). Estes estudos evidenciam que o risco de câncer de pulmão associado com diferentes polimorfismos no *locus* 5p15.33 varia conforme a etnia (WEI; DEVILBISS; LIU, 2015). Mas apesar desses polimorfismos terem sido identificados em genes associados à telomerase em câncer de pulmão, não há dados de aplicação clínica desses resultados em estratégias de prevenção do carcinoma pulmonar.

Outros estudos procuram correlação entre atividade da telomerase e o estágio de desenvolvimento do tumor. Grande parte das pesquisas mostraram que o aumento da atividade da telomerase nas células tumorais está associada a estágio avançados do tumor (IIIB e IV) (MARCHETTI et al., 1999; TAGA et al., 1999; GONZÁLEZ-QUEVEDO et al., 2002; FUJITA et al., 2003; HSU et al., 2004; CHEN et al., 2006; ZHU et al., 2006; TARGOWSKI et al., 2008; BRENNAN; HAINAUT; BOFFETTA, 2011) e / ou reduzida sobrevida dos pacientes (MARCHETTI et al., 1999; TAGA et al., 1999; GONZÁLEZ-QUEVEDO et al., 2002; FUJITA et al., 2003; WU et al., 2003a; CHEN et al., 2006; ZHU et al., 2006; FRÍAS et al., 2008; TARGOWSKI et al., 2008). No entanto, outros grupos não encontraram nenhuma relação entre atividade da telomerase no tecido tumoral e estágio de desenvolvimento do tumor no pulmão ou sobrevida do paciente (HIRASHIMA et al., 2000; HSU et al., 2004). Os dados contraditórios encontrados na literatura podem ser devido ao pequeno número de amostras analisadas e à heterogeneidade tumoral. Portanto, ainda não é possível determinar se há uma associação entre a atividade da telomerase e o estadiamento tumoral ou sobrevida de pacientes com câncer de pulmão (GANSNER; ROSAS, 2013)

Outro estudo verificou a concordância na expressão de genes associados à telomerase e a maquinaria telomérica em pacientes com câncer de pulmão NSCLC. Nesse estudo foram analisadas 78 amostras: 42 do subtipo LUSC e 36 do subtipo LUAD. Os

genes analisados foram: *TERT*, *TERC*, *TP1* (*telomerase-associated protein*), *MYC* (*gene que codifica o fator de transcrição que regula expressão do gene TERT*), *TRF1*, e *TRF2*. Identificou-se que a atividade da telomerase estava presente em 60.3% dos pacientes e a expressão dos genes *TERT*, *TERC*, *TP1*, *Myc*, *TRF1* e *TRF2* foram observadas em 66,6, 92,3, 100, 91,0, 74,4 e 83,3% dos tecidos tumorais, respectivamente. Alta atividade de telomerase foi encontrada em pacientes em estágios avançados da doença. Além disso, tecidos tumorais positivos para as proteínas TERT e TRF1, também apresentavam alta expressão do gene *TERT*, embora não tenha sido encontrada correlação entre a expressão dos genes e a atividade da enzima. Entretanto a expressão do gene *TERT* parece estar associada à expressão dos genes *TRF1*, *TRF2* e *MYC*. Embora estes resultados sejam importantes, ainda são preliminares para se entender os mecanismos de controle da manutenção telomérica em NSCLC (HSU et al., 2003).

O mesmo grupo também investigou se há correlação na razão entre o comprimento do fragmento de restrição telomérica t/n-TRFLR (*tumour-to-normal telomere restriction fragment length ratio*) de tecidos tumorais e histologicamente normais, e a atividade da telomerase sobre a influência de TRF1 e TRF2, proteínas do complexo *shelterin*. Nesse estudo foram analisados 79 pacientes com NSCLC. Observou-se que os TRFLR eram mais curtos nos tecidos tumorais e naqueles telomerase positivos, e que um menor t/n-TRFLR ( $\leq 75\%$ ) estava associado com uma alta expressão de *TRF1* e *TRF2*, mas não a expressão dos genes *MYC*, *TERT*, ou *TERC* e a atividade de telomerase. Sugerindo uma estreita associação entre o encurtamento telomérico e a expressão dos genes *TRF1/TRF2* (HSU et al., 2007a). Em contraste, um estudo com pacientes NSCLC demonstrou baixo nível de expressão de *TRF1* nos tecidos tumorais, porém sem alteração na expressão de *TRF2*, *POT1* e *RAP1*. Contudo, os autores mostram que a expressão aumentada de *RAP1* nas células tumorais está associada com uma maior sobrevida dos pacientes (LIN et al., 2006).

ANTONIOU et al. (2013) avaliou diferenças nos níveis de expressão dos genes *TERT* e *TERC* em tecidos de pacientes com NSCLC e em fluido broncoalveolar de pacientes com fibrose idiopática pulmonar (IPF), pois há indicações de vias patogênicas comuns nessas doenças. Foi demonstrado que tanto a expressão de *TERT* e *TERC* estavam diminuídas em tecidos de pacientes com IPF em comparação com pacientes com NSCLC. Esses resultados, portanto, não suportam a hipótese de uma via comum para a telomerase nessas doenças, mas revelam perfis de ativação de telomerase distintos.

Tendo como base estudos que divergem quanto à correlação entre a média do tamanho dos telômeros e o risco de câncer de pulmão: dois estudos retrospectivos de caso controle (WU et al., 2003b; JANG et al., 2008) mostraram que o encurtamento dos telômeros em leucócitos está significativamente associado,  $p \leq 0,05$ , com um aumento de 2 a 3 vezes do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Adicionalmente, um grupo de pesquisa nos EUA (SUN et al., 2015), avaliou a associação entre a variação do tamanho telomérico (*telomere length variation- TLV*), média do comprimento telomérico (*telomere length-TL*) em linfócitos e o risco de desenvolver câncer de pulmão (NSCLC) em pacientes da região de Baltimore. Esses pesquisadores mostraram que a TLV estava significativamente associada,  $p \leq 0,05$ , com o risco de câncer e essa associação foi modulada pela idade. Salientou-se que a combinação de TLV e a média do comprimento telomérico melhora a estratificação para o risco de câncer de pulmão. Na faixa etária mais jovem, indivíduos que tinham telômeros curtos e alta TLV tiveram 8 vezes maior risco de desenvolver câncer de pulmão do que aqueles que têm telômeros mais longos e baixo TLV. Se confirmado por estudos futuros, TLV e a média do comprimento dos telômeros em linfócitos podem ser incorporados em um painel de biomarcadores para avaliação de risco de câncer de pulmão (SUN et al., 2015). Em contraste, estudos estimaram o comprimento telomérico em leucócitos (*Leucocyte Telomere Length- LTL*) de pacientes com câncer de pulmão em um grupo de homens fumantes na Finlândia e verificou-se que longos LTL estão diretamente associados com aumento do risco de desenvolver câncer de pulmão (SHEN et al., 2011). Outro estudo com a população Chinesa mostrou resultado similar (LAN et al., 2013; WEI; DEVILBISS; LIU, 2015).

Em vista do exposto, esse estudo propõe verificar alterações na expressão de genes associados com a maquinaria telomérica (exemplo: *TERT*, *TER* e componentes do complexo *shelterin*) e no tamanho dos telômeros em amostras de tecido tumoral e tecido pulmonar normal de pacientes com NSCLC dos subtipos histológicos LUAD e LUSC.

## 2 OBJETIVO GERAL DA PROPOSTA

Investigar alterações de expressão em genes associados aos telômeros e avaliar o tamanho telomérico em amostras de NSCLC dos subtipos adenocarcinoma (LUAD) e carcinoma de células escamosas (LUSC).

### 2.1 Objetivos específicos

1. Analisar a expressão de genes associados com a maquinaria telomérica, utilizando RT-qPCR, em amostras de tecido tumoral e tecido histologicamente normal adjacente de pacientes com NSCLC.
2. Analisar a expressão de genes associados com a maquinaria telomérica utilizando dados de RNA-Seq obtidos de tecido tumoral e tecido histologicamente normal adjacente de pacientes com NSCLC.
3. Investigar o perfil de expressão de genes associados aos telômeros utilizando dados de RNA-Seq, disponíveis no banco de dados público TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), e obtidos de amostras de pacientes com NSCLC.
4. Avaliar o perfil de restrição de comprimento telomérico (TRF) em amostras tumorais e normais adjacentes ao tumor de pacientes diagnosticados com NSCLC.
5. Avaliar os TRFs de leucócitos de pacientes diagnosticados com NSCLC em comparação com amostras de doadores saudáveis.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Dados das amostras

Esse trabalho foi conduzido utilizando amostras (tecido e sangue) previamente coletadas e armazenadas pela equipe de pesquisa da Profa. Dra. Patrícia Pintor dos Reis (Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP). O estudo coordenado pela Dra. Patrícia, no qual as amostras foram coletadas, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CAEE 34958514.0.0000.5411). Os pacientes e participantes elegíveis para a pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido anteriormente à coleta de amostras. Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de carcinoma pulmonar, submetidos à cirurgia, não sendo tratados previamente com quimioterapia ou radioterapia, tumores de qualquer localização anatômica nos pulmões e de qualquer estadiamento e grau histológico. Os critérios de exclusão foram: pacientes com doença metastática secundária nos pulmões e pacientes com comorbidades tais como diabetes ou em grave estado de saúde apresentando caquexia.

As amostras utilizadas nos ensaios de RT-qPCR e *Southern Blot* são de tecido tumoral e histologicamente normal, adjacente ao tumor de pacientes diagnosticados com NSCLC dos subtipos LUAD e LUSC - Anexo 1. Nesses ensaios, as amostras utilizadas são de pacientes tratados no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCB – FMB, UNESP). Os ensaios de *Southern Blot* foram realizados também com amostras de sangue periférico (leucócitos) - Anexo 3. Para esse ensaio também foram incluídas análises com amostras obtidas de indivíduos controle (saudáveis, sem doença) - Anexo 4. A análise de transcrito utilizou dados de RNA-Seq gerados em amostras de pacientes tratados no Hospital do A. C. Camargo, SP – Anexo 2.

Foram analisados também os dados do transcrito de amostras de tumores e tecidos normais adjacentes de pacientes com câncer de pulmão, disponíveis no banco de dados público: *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*.

Os métodos utilizados nesta pesquisa encontram-se resumidos na Figura 5 (item 4).

### 3.2 Metodologia de extração de RNA

As amostras de tecido tumoral e normal adjacente ao tumor foram cortadas (50-100mg), maceradas em nitrogênio líquido e imersas em 1 mL de trizol e incubadas temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foi adicionado 200 µL de clorofórmio em cada amostra, as quais foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e submetidas à centrifugação a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) resultante da centrifugação foi removida cuidadosamente e colocada em um novo tubo eppendorf, seguida da adição de 500 µL de isopropanol. A amostra em isopropanol foi colocada na coluna de purificação do *RNeasy Qiagen kit* e seguida a extração do RNA, segundo o protocolo do fabricante. As amostras foram submetidas à purificação utilizando o *RNAse-free DNase set* (Qiagen), otimizado para uso com o *RNeasy Qiagen kit*, para digestão de DNA que possa estar presente na amostra de RNA. O protocolo seguiu as instruções do fabricante, com adição de 70 µL de tampão RDD (*RNAse-free buffer*) mais 10 µL de enzima DNase I a cada amostra. Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 8000, *Thermo Scientific*), e a qualidade do RNA avaliada utilizando *Bionalyzer* (Agilent).

### 3.3 Metodologia de extração de DNA

A extração de DNA foi realizada nas amostras de tecidos (tumoral e normal adjacente) e de *buffy coat* obtidas de pacientes com NSCLC, com o objetivo de quantificar alterações teloméricas específicas. Nas amostras o DNA foi extraído utilizando o *Kit DNeasy blood & Tissue* (Qiagen). Esses métodos de extração são baseados na obtenção e purificação do DNA em membranas de sílica. Os protocolos foram realizados segundo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram avaliadas quanto à quantidade e qualidade utilizando o espectrofotômetro (NanoDrop 8000, *Thermo Scientific*).

### 3.4 Metodologia de validação de alterações na expressão de genes associados a maquinaria telomérica: PCR quantitativa em tempo real

A metodologia de análise da expressão gênica pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) envolve uma etapa inicial de Transcrição Reversa (RT) para conversão

de mRNA em cDNA seguida da amplificação pela PCR quantitativa. Para a RT, utilizamos o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)*. Resumidamente, 1000ng de RNA foram adicionados à reação de *2X RT Master Mix* (20µL de volume por reação) que contém 2µL de *10X RT Buffer*, 0,8 ul de *25X dNTP Mix* (100Mm), 2ul de *10X RT Random Primers*, 1ul de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e *Nuclease-free water* (quantidade suficiente para completar 20 ul de reação), fornecidos pelo Kit. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C. Após o término da reação, as amostras de cDNA foram imediatamente congeladas e mantidas em freezer a -20°C. Controles negativos foram incluídos em cada reação de síntese de cDNA para garantir a ausência de contaminação. O *RNA Universal Reference (Agilent Technologies)* foi utilizado como controle positivo em todas as reações. Para a PCR quantitativa, o protocolo utilizou mix de reação no total de 9 ul, contendo: 300nM de cada primer, 3,15 µL de *Power SYBR Green mix (Applied Biosystems)* e ddH<sub>2</sub>O livre de DNase/RNase (Sigma) em quantidade suficiente para completar 9 ul de reação. A cada mix de reação (9ul) foram adicionados 1ul (5ng) do cDNA sintetizado de acordo com o protocolo de transcrição reversa. O equipamento utilizado foi o *QuantStudio 12K (Life Technologies)*. Curvas de dissociação foram incluídas em todas as amplificações para assegurar a produção de produtos específicos. Os valores de Ct (*threshold cycle*), que constitui o número de ciclos na PCR quantitativa correspondente à amplificação estatisticamente significativa foram utilizados na análise dos dados, pelo método *DeltaDelta Ct* (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nessa análise, o fator de normalização foi obtido através da média geométrica dos valores de Ct dos controles endógenos: os genes B2M e RPS13. Os genes endógenos foram previamente analisados em outros estudos (BOUTROS et al., 2009; LOCKWOOD et al., 2010; ZHU et al., 2010; HAI et al., 2012) e por análises utilizando os programas LinReg PCR e DataAssist™ que mostraram que os genes B2M e RPS13 eram os mais estáveis para as análises com amostras de tecido pulmonar tumoral e tecido pulmonar normal, adjacente ao tumor. Abaixo, segue a Tabela 2 com as sequências dos iniciadores utilizados para as análises desta etapa do projeto.

Tabela 2 - Lista dos genes e sequências dos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR

Gene (símbolo)	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
TERRA1q2q10q13q	GAATCCTGCGCACGAGAT	CTGCACCTTGAAACCCCTGCAATAC
TERRA15q	CAGCGAGATTCTCCAAAGCTAAG	AACCCCTAACCCATGAGCAACG
TERRA20q	GCAAGCTTTCTCAGCACAC	TTTGTTCACCTGCTGATGCG
HSP90AA1	CACTTGCGCATGAAAGCATTTTT	GGGACAAATAAGGGCTCTGA
TRF1	CGGCTGGA TGCTCGA TTT	GCCGTCGCGGAAAGCT
TRF2	CTGAGGCAAGCCTTTGCAA	GGAGAGCTTGAGTAGGAAAGAACCA
POT1	TGTTCAAGCCAAATGCAATTTTTG	GCTCCGTCCACTTCTGCTTT
TERT	CTGCGGCGGATTGTGAA	TTTTCTCTGCGGAAAGTTCTG
TERC	GCGCCGTGCTTTTGCT	TTTTCCGCCCGCTGAA
PINX1	AAAGTCGCGGAAAGCA	CATTACTCCAGGCAAGTTCTGA
RTEL1	CACTGCAAAGGCAAGGACTT	TGTGAAGAGCGCTGCTTGTG
TEN1	GGAGGTTAGTGCAAGGCAAGT	AGGCAACAACCTGCCAAATGT
ATRX	CCCATGATGAAAGCAAGTTGA	ATGAGTGTGCAAGGAAAGTCA TGA
DAXX	CGAAGTCAAGTCAATCTCATC	CGCCTGGCCTAAGTCA TCTG
STAG2	ACCATTAAGCAAGCGGCTGAA	TGCTGTAAGCAAGCCTTTTCT
SMG6	CAGCAAAGAGGCAAGCAATCC	TCCGCTCATCCGCAACAG
MRE11	TGGCAACCTCAACATTTCAAAT	TGCCCTGTGGGATCGT
SUV39H1	GGAGCAAGCGCAAGAACTCTC	TTTCTAAGTCCCTGTGGAAGCTGCTT
RUVBL2	TGGACATCGAAGCTTCTCCTT	GGACAAGCGCAAGTCA
RUVBL1	ATGGCTCCCATGCTCATCTT	CCTCAAGTCCCTGATGACACA
BRCA2	GCATGCAAAATGATCCCAAGTG	GCAAGTGTACGGCCCTGAAAGT
TINF2	CTGTGGATTTGGCCCTCGAA	GCCAGAAAGGGTTCCCCATA
RPA3	CGGGCATGCTAGCTCAATTC	CTTTTCCAGCCTCCCTACGA
DNMT3B	CCCATGCAAGATCTCTCAA	CCGGCCTGTACCTCA TACA
DNMT3A	CCTGTGGAGCCTCAATGTTA	CTTGCAAGTTTGGCAATTC
TNKS2	GAAAAAGGAGGTTCCAGGAGTAGAT	CCATTAGGTGCTCAAGTCCAAAG
RAD51	TTTGGCCCAACCCATT	TCTTCACTGCTGGCAATTTATG
DKC1	GCCACTCGCTTGGTGAAGTC	CCGGACAATCCCACTACT
<b>B2M</b>	<b>GTCTCGCTCCGTGGCCTTA</b>	<b>TGAAACCCAGACACATAGCAATTC</b>
<b>RPS13</b>	<b>CCAGTCGGCTTTACCCTATCG</b>	<b>TGTGCAACACCATGTGAATCTC</b>

Nota: Em negrito a sequência dos iniciadores, utilizados como endógenos. *F*: Forward (*senso*); *R*: Reverse (*reverso ou anti-senso*)

A sequência dos iniciadores *TERRA 1q2q10q13q* e *TERRA 15q* foram retiradas de SCHEIBE, et al. (2013) e a sequência do iniciador *TERRA 20q* foi cedida pelo pesquisador Dr. Claus Azzalin -Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal. As demais sequências foram desenhadas utilizando o software *Primer Express Software v3.0*.

### 3.5 Análises estatísticas dos dados (RT-qPCR)

Para a análise de expressão gênica utilizando RT-qPCR, foram utilizadas amostras de tumores e tecidos pulmonares histologicamente normais de 28 pacientes com NSCLC (28 amostras tumorais e 15 normais adjacentes), tratados no HCB - FMB - UNESP. Utilizou-se o teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* para comparar os dados não pareados da expressão de genes, envolvidos com a maquinaria telomérica nos dois grupos (tumor vs. normal). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor p do teste estatístico é inferior ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando o software Prism versão 6.0 para Windows. A análise estatística foi realizada pelo software Minitab versão 16 para Windows. As

análises estatísticas foram realizadas em colaboração com o Dr. Rogério Oliveira, Departamento de Bioestatística-Instituto de Biociências de Botucatu- UNESP.

### 3.6. Análise bioinformática dos dados de RNA-Seq

Os dados de RNA-Seq foram gerados utilizando a plataforma Illumina® (*Illumina*, San Diego, CA, EUA). Foram gerados perfis do transcriptoma codante de um total de amostras de 7 pacientes (7 tumores do subtipo LUAD e 7 tecidos pulmonares normais, adjacente ao tumor dos mesmos pacientes) -Anexo 2. Utilizou-se o protocolo do kit *TruSeq Total RNA Library* (*Illumina*, EUA) para extração e montagem das bibliotecas. A qualidade das mesmas foi confirmada usando o equipamento *Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas no padrão *paired-end* por meio do equipamento *HiScan SQ* (*Illumina*), gerando 50 milhões de pares de reads (de aproximadamente 101 pares de bases cada) por amostra. A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o programa *FastQC* ([bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)).

Utilizou-se a ferramenta *FASTX Clipper* do pacote *FASTX-Toolkit*: ([extr://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/commandline.html#fastx\\_clipper\\_usage](http://extr://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/commandline.html#fastx_clipper_usage)) para a remoção de sequências de adaptadores, *primers*, artefatos e contaminantes, possivelmente gerados no sequenciamento. Os arquivos *fastq* foram filtrados baseados na qualidade dos *reads* (*Phred Quality Score*  $Q \geq 30$ ) (BABRAHAM INSTITUTE, 2013). O mapeamento dos *reads* filtrados foi efetuado com o *software TopHat2 v2.1.0* (KIM et al., 2013). Tanto o genoma humano de referência utilizado, *GRCh38.dna.toplevel* indexado com o *software Bowtie2 v2.2.1* (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), quanto o arquivo de anotação gênica mais recente (versão GRCh38.86) no formato GTF (*Gene Transfer Format*) foram baixados a partir do *Ensembl* ([extr://www.ensembl.org/extra.html](http://extr://www.ensembl.org/extra.html)). A contagem bruta dos *reads* para cada gene foi realizada por meio do *software Htseq v0.6.1* (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) e a análise de expressão diferencial foi executada usando o pacote de ferramentas estatísticas *edgeR:Bioconductor v3.18.1*. (função *exactTest*) (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009).

Adicionalmente, dados públicos de RNA-Seq (42 e 43 amostras pareadas para LUSC e LUAD, respectivamente) foram obtidos a partir do *The Cancer Genome Atlas project* (TCGA), sendo o download de arquivos no formato *htseq* feito através do portal <https://gdc-portal.nci.nih.gov/> (THE CANCER GENOME ATLAS, 2017). As análises de

expressão diferencial dos dados do TCGA foram realizadas seguindo o mesmo método mencionado no parágrafo anterior (*EdgeR - exactTest*) (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009), considerando  $p \leq 0,05$ .

As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com o Dr. Elton Rosas de Vasconcelos, pesquisador na “*Western University of Health Sciences*” (Pomona, CA, USA).

### 3.7. Metodologia para medir o perfil de restrição do comprimento telomérico (Southern blot telomérico)

O DNA genômico de leucócitos (pacientes portadores de NSCLC e indivíduos saudáveis) e de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes com NSCLC, foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen). Para análise do TRF utilizou-se o kit *TeloTAGGG Telomere Length Assay* (Roche) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA genômico foi digerido com as enzimas *HinfI* e *RsaI* para a obtenção dos fragmentos teloméricos. Seguido a digestão, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel 1% durante 4,5h. O gel foi desnaturado, neutralizado e as amostras transferidas para membrana de nylon por *Southern blotting* e hibridizadas por sonda específica  $(TTAGGG)_3$  para região telomérica. Os fragmentos teloméricos foram detectados por quimiluminescência. E os TRFs calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\overline{\text{TRF}} = \sum (OD_i) / \sum (OD_i) / (L_i)$$

$OD_i$  corresponde ao sinal de quimiluminescência e  $L_i$  o tamanho do fragmento na posição dada.

Utilizou-se o teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* para comparar os dados não pareados de TRF, entre os grupos tumor vs. normal. Correlação de *Spearman* foi calculada para estudar a possível relação linear das variáveis de TRF e idade do paciente doador.

Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor  $p$  do teste estatístico é inferior ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

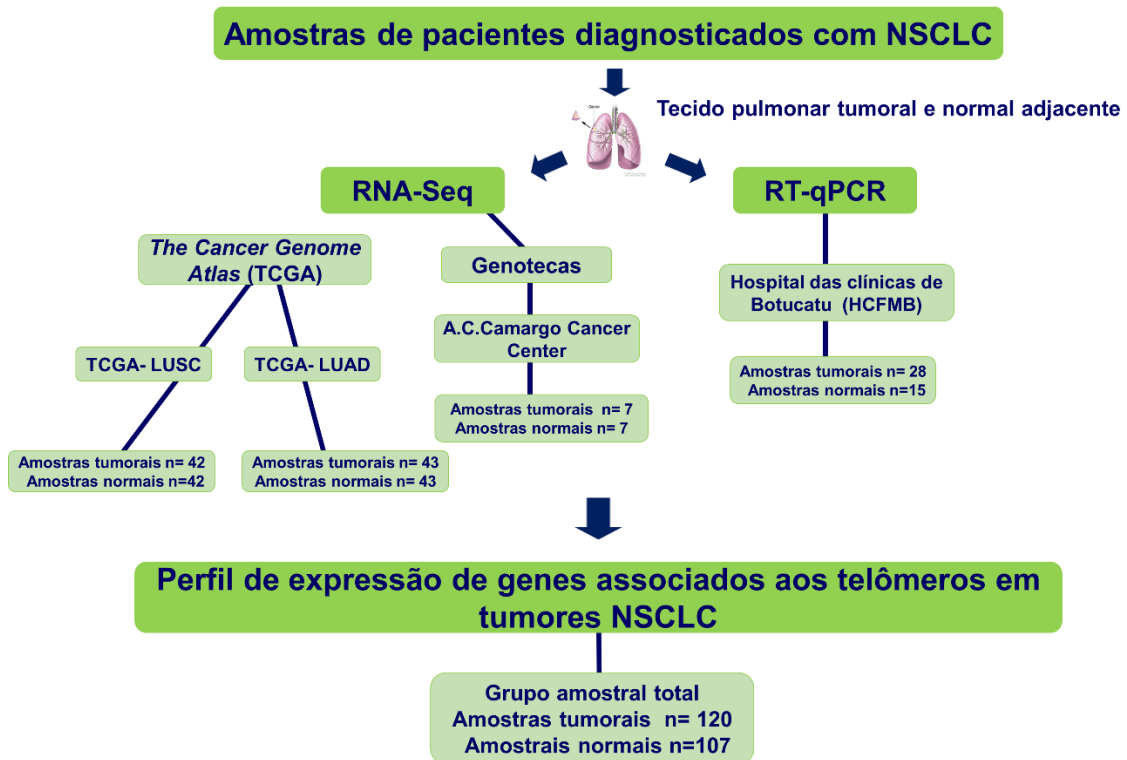
A Figura 5 resume os métodos utilizados para a análise de expressão de genes associados aos telômeros. A análise foi conduzida utilizando amostras de tecidos tumorais e tecido pulmonar normal, adjacente ao tumor de pacientes diagnosticados com NSCLC. Foram utilizadas as técnicas de:

1) RT-qPCR para análise de expressão em amostras de 28 pacientes (28 amostras tumorais e 15 amostras de tecidos normais adjacentes) com NSCLC, tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

2) Análise de transcrito utilizando dados de RNA-Seq de amostras tumorais de 7 pacientes com NSCLC (7 amostras tumorais e 7 amostras de tecidos pulmonares normais, dos mesmos pacientes) tratados no Hospital A. C. Camargo.

3) Análise de transcrito utilizando dados de RNA-Seq de amostras tumorais provindas de 85 pacientes diagnosticados com NSCLC, cujos dados estavam disponíveis no banco de dados público *TCGA* (*The Cancer Genome Atlas*), sendo que 42 pacientes foram diagnosticados com NSCLC do subtipo LUSC (42 amostras tumorais e 42 amostras de tecidos normais adjacentes) e 43 pacientes com NSCLC do subtipo LUAD (43 amostras tumorais e 43 amostras de tecidos normais adjacentes).

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



Somados a estes experimentos foram realizadas análises do perfil de restrição telomérico (TRF), por *Southern blot* telomérico, de amostras tumorais (n=11) e normais adjacentes (n=4) de pacientes diagnosticados com NSCLC. Similarmente foram analisados os TRFs de DNA genômico extraído de leucócitos de pacientes diagnosticados com NSCLC (n= 14) e de doadores saudáveis (n=13).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC

Com o objetivo de verificar se genes envolvidos com a manutenção telomérica estão diferencialmente expressos em amostras NSCLC, foram feitas análises de expressão gênica utilizando a metodologia da RT-qPCR. Nessas análises, foram utilizadas amostras tumorais (n=28) e histologicamente normais, adjacentes ao tumor dos mesmos pacientes (n=15). Foram excluídas das análises 13 amostras histologicamente normais, sendo que o critério para exclusão foi: amostras que apresentaram alta expressão de *TERT* e amostras com baixa integridade do RNA. Está bem fundamentado na literatura que a maioria das células somáticas apresenta atividade baixa ou nula da telomerase, justificando a baixa ou nenhuma expressão do gene que codifica o componente TERT (ULANER et al., 1998; DOJOSUBROTO et al., 2003; SCHAETZLEIN; RUDOLPH, 2005; BLASCO, 2005; SAVAGE, 2014). Apesar dessas amostras se apresentarem normais histologicamente, constituem tecidos adjacentes ao tumor, sendo assim possível que contenham alterações moleculares associadas ao processo de imortalização celular, como a reativação da atividade de telomerase aqui representada pela expressão do gene *TERT* (KIM et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A maioria dos pacientes, cujas amostras foram analisadas nesse estudo, é do sexo masculino (68%) e tabagista (96%). Sendo que 46% dos pacientes apresentaram idade maior que 65 anos ao diagnóstico. Considerando-se os subtipos histológicos de NSCLC, 16 amostras eram de tumores LUSC, 10 de LUAD, 1 LCC e 1 amostra de tumor misto (LUAD e LUSC). A Tabela 3 apresenta o perfil clínico e histopatológico dos pacientes.

**Tabela 3 - Perfil clínico e histopatológico dos casos incluídos no estudo de expressão gênica via RT-qPCR**

<b>Pacientes (n)</b>	<b>28</b>	<b>%</b>
<b>Tipo Histológico</b>		
Carcinoma de células escamosas	16	57%
Adenocarcinoma	10	36%
Outros	2	7%
<b>Sexo</b>		
Feminino	9	32%
Masculino	19	68%
<b>Idade</b>		
≤ 65 anos	15	54%
> 65 anos	13	46%
<b>Tabagismo</b>		
Sim	27	96%
Não	1	4%

Nota: Outros: 1 amostra tumoral mista (LUAD e LUSC) e outra amostra tumor LCC.

Nesta etapa do estudo, foram analisados os perfis de expressão de 24 genes que codificam proteínas de suma importância para a manutenção telomérica, como: componentes do complexo *shelterin*, TERF1 (TRF1), TERF2 (TRF2), TIN2 (TIN2) e POT1 (DE LANGE, 2005) e do complexo CST: TEN1 (GAO et al., 2007; CHEN; LINGNER, 2013). Esses complexos exercem papel fundamental na manutenção, estabilidade telomérica e regulação do acesso da telomerase aos telômeros (DE LANGE, 2005; CHEN; LINGNER, 2013). Adicionalmente, foi analisado a expressão do gene que codifica TNKS2 (*Tankyrase 2*), proteína que auxilia na regulação do tamanho telomérico pela interação com TRF1 (HSIAO; SMITH, 2008).

Foi analisada também a expressão de genes que codificam proteínas que são fundamentais na regulação e biogênese do complexo telomerase: TERT, a subunidade catalítica da telomerase (GILSON; GÉLI, 2007); componentes do complexo telomerase: a proteína DKC1, responsável pela estabilização da junção de TERT/ TERC (ALAWI; LIN, 2011), e a proteína EST1A, codificada pelo gene *SMG6* e envolvida no processo de replicação telomérica (COLLINS, 2006). Assim como RUVBL1 (*Pontin*) e RUVBL2 (*Reptin*) que estão envolvidas na biogênese do complexo telomerase (VENTEICHER et al., 2008) e HSP90AA1, chaperona que atua na regulação da atividade, estabilidade e localização do complexo telomerase (COLLINS, 2006). Ademais, foi avaliada a expressão de PinX1, proteína com papel de inibidor natural da telomerase (SOOHOO et al., 2011).

Foi quantificada a expressão dos genes *DNMT3B* e *DNMT3A*, envolvidos em processos de metilação de regiões subteloméricas e regulação do tamanho dos telômeros (GONZALO et al., 2006). Assim como o gene que codifica a proteína SUV39H1, envolvida na regulação epigenética dos telômeros, exercendo função na organização da heterocromatina, estabilidade genômica e regulação do tamanho telomérico (GARCÍA-CAO et al., 2003).

Investigou-se também proteínas com papel de reparo a danos nos telômeros como MRE11, RAD51, RPA3 e BRCA2, ATRX (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*), DAXX (*Death-Domain Associated Protein*) (BADIE et al., 2010; LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016) e RTEL1 envolvida também com a estabilidade, proteção e alongação dos telômeros (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). Estudos mostraram que há associação entre mutações de perda de função nos genes *ATRX* e *DAXX* e a presença de mecanismos ALT (KILLELA et al., 2013).

Adicionalmente, foi analisada a expressão de *STAG2* que codifica a proteína SA2, responsável pela coesão dos centrômeros. Geralmente esse gene é encontrado inativo em células tumorais humanas, porém tumores que contém *STAG2* ativo podem apresentar mecanismos semelhantes a ALT, com altas taxas de recombinação homóloga por trocas de fragmentos entre cromátides irmãs. Ao contrário das células ALT, os tumores que expressam *STAG2* são telomerase positivo (DANILOSKI; SMITH, 2017). A análise do perfil de expressão dos genes *ATRX*, *DAXX* e *STAG2* nas amostras dos pacientes NSCLC pode ser indicativo do mecanismo utilizado pelas células tumorais para a manutenção telomérica.

O teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* foi utilizado para cada um dos genes para testar as hipóteses estatísticas de que as medianas observadas nos grupos são iguais ou diferentes para as amostras tumorais e normais. As análises estatísticas não pareadas entre os grupos amostrais (tumor e normal) revelaram, conforme verificado na Tabela 4 e Figura 6 abaixo, diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na expressão de 12 genes analisados, sendo que estes apresentaram expressão aumentada nas células tumorais em relação às normais. Os genes com expressão aumentada foram: *TERT* ( $p= 0,000$ ), *RAD51* ( $p= 0,000$ ), *DNMT3B* ( $p= 0,000$ ), *RPA3* ( $p= 0,000$ ), *BRCA2* ( $p=0,001$ ), *SUV39H1* ( $p= 0,001$ ), *DKC1* ( $p= 0,001$ ), *RUVBL1* ( $p= 0,004$ ), *RUVBL2* ( $p= 0,005$ ), *POT1* ( $p= 0,012$ ), *DNMT3A* ( $p= 0,015$ ) e *MRE11* ( $p= 0,034$ ).

As tabelas e gráficos estão organizados na ordem do menor para o maior valor de p.

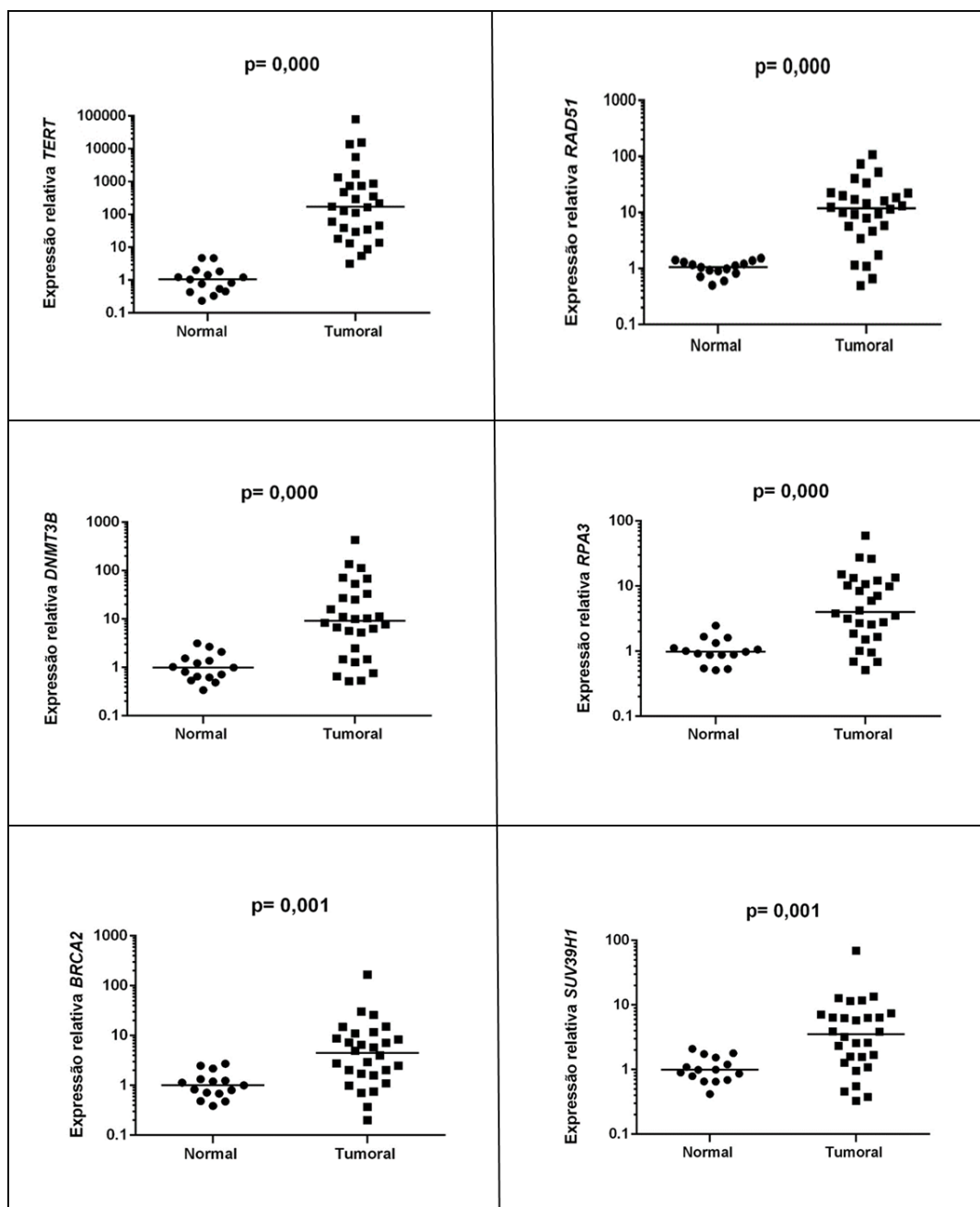
**Tabela 4 - Expressão relativa de genes envolvidos com a maquinaria telomérica em amostras de NSCLC**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERT</i>	7015	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,054 170,626	<b>0,000</b>
<i>RAD51</i>	5888	<i>RAD51 recombinase</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,051 11,982	<b>0,000</b>
<i>DNMT3B</i>	1789	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,999 9,188	<b>0,000</b>
<i>RPA3</i>	6119	<i>Replication protein A3</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,979 4,013	<b>0,000</b>
<i>BRCA2</i>	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,005 4,457	<b>0,001</b>
<i>SUV39H1</i>	6839	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,991 3,522	<b>0,001</b>
<i>DKC1</i>	1736	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,895 2,891	<b>0,001</b>
<i>RUVBL1 (Pontin)</i>	8607	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,024 3,093	<b>0,004</b>
<i>RUVBL2</i>	10856	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,855 2,133	<b>0,005</b>
<i>POT1</i>	25913	<i>Protection of telomeres 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,916 1,618	<b>0,012</b>
<i>DNMT3A</i>	1788	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,904 2,471	<b>0,015</b>
<i>MRE11</i>	4361	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,100 2,252	<b>0,034</b>
<i>DAXX</i>	1616	<i>Death domain associated protein</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,887 2,007	0,063
<i>TERF2 (TRF2)</i>	7014	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,932 1,414	0,070
<i>HSP90AA1</i>	3320	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,960 1,514	0,083
<i>STAG2</i>	10735	<i>Stromal antigen 2</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,727 1,328	0,273
<i>TNKS2</i>	80351	<i>Tankyrase 2</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,061 1,356	0,285
<i>RTEL1</i>	51750	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,956 1,219	0,516
<i>PINX1</i>	54984	<i>PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,945 1,028	0,533
<i>TERF1 (TRF1)</i>	7013	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,246 1,001	0,610
<i>TINF2</i>	26277	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,977 0,957	0,646
<i>TEN1</i>	100134934	<i>TEN1, CST complex subunit</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,092 0,920	0,760
<i>SMG6 (Est1)</i>	23293	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,977 0,971	0,799
<i>ATRX (RAD54)</i>	546	<i>ATRX, chromatin remodeler</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,929 0,860	0,959

Nota: Teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (tumoral vs. normal).  $p < 0,05$ .

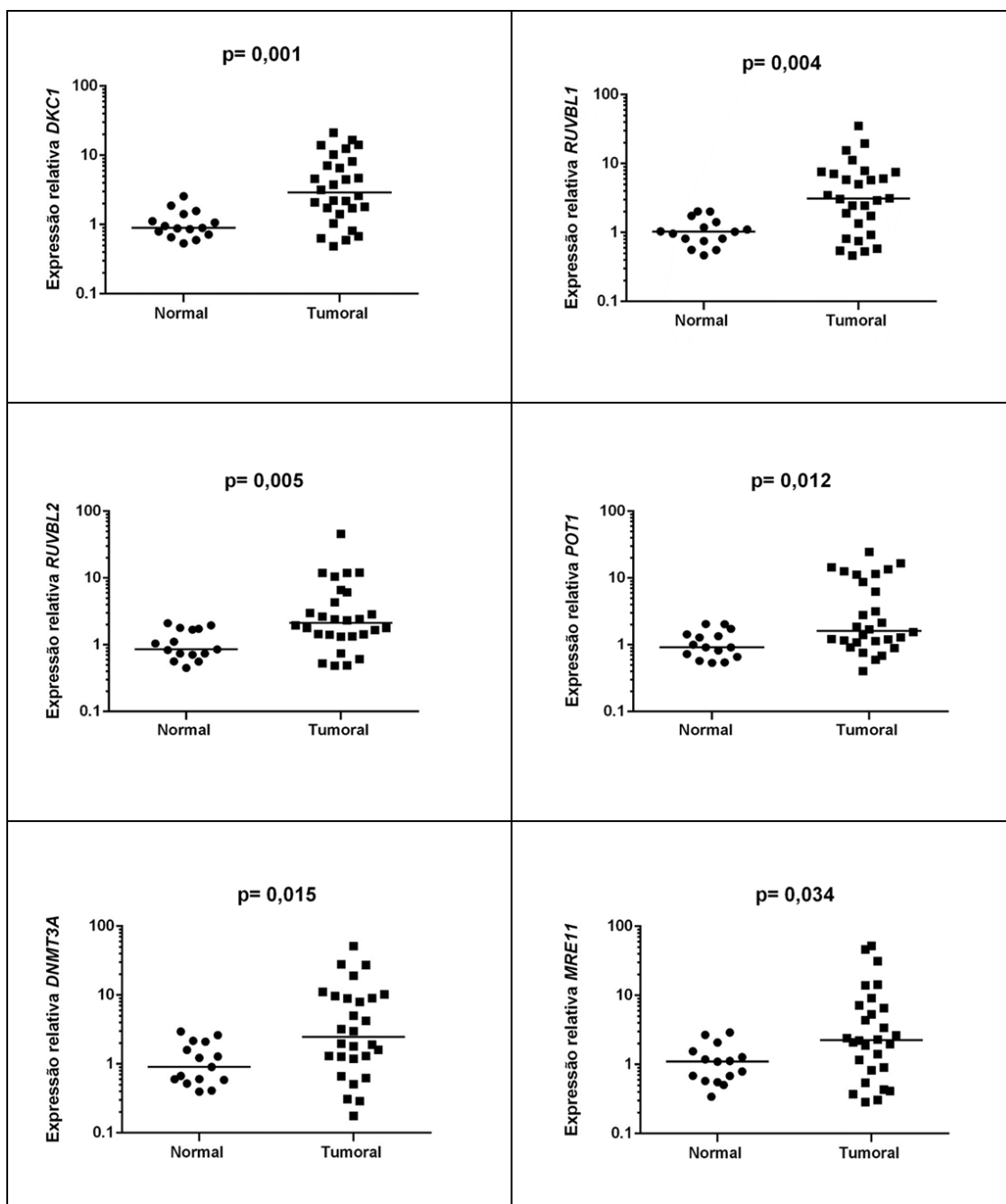
Nos gráficos, Figura 6, podemos verificar os valores observados de expressão relativa para cada amostra analisada.

Figura 6 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) em tumor vs normal



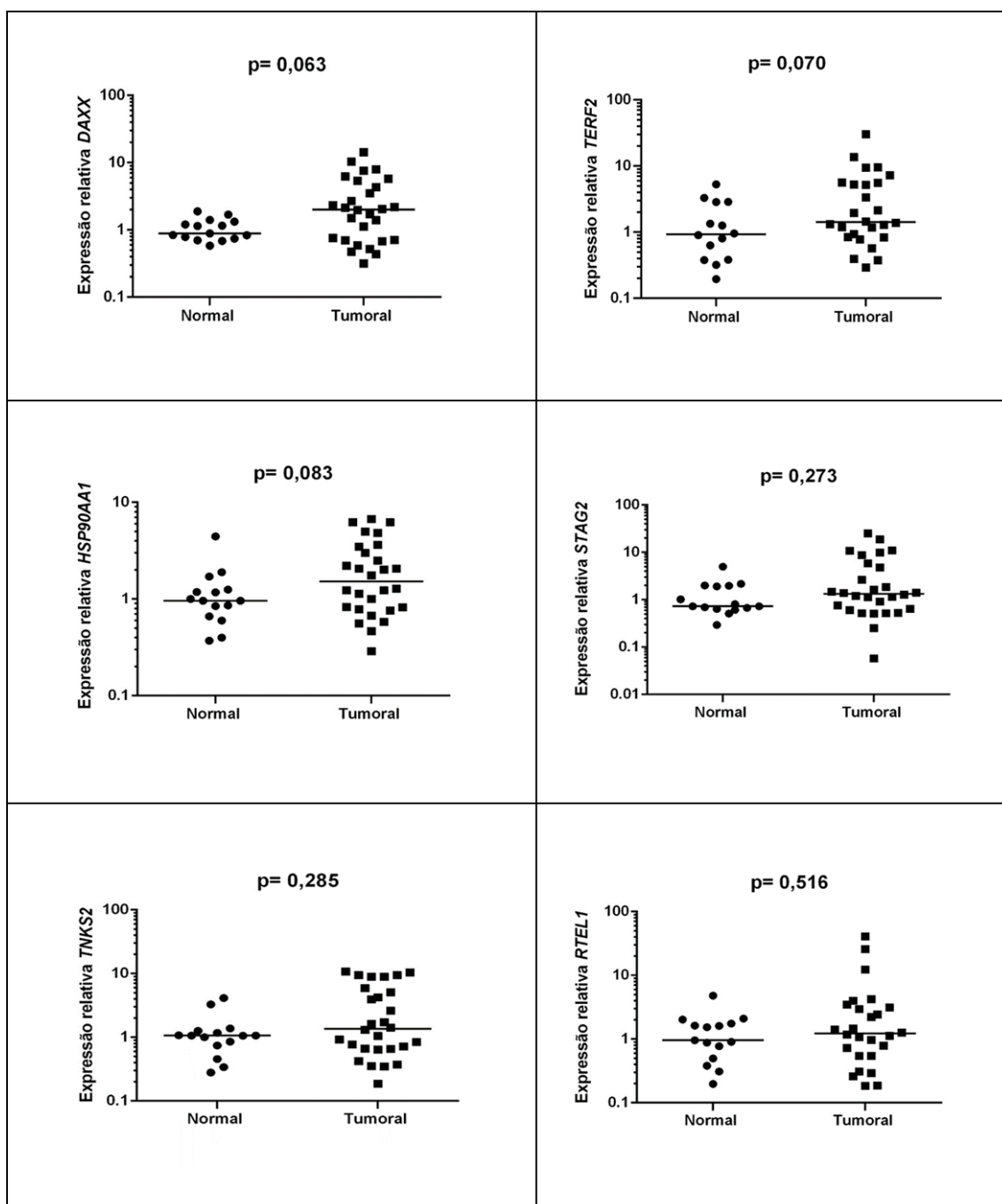
“continua”

“continuação”



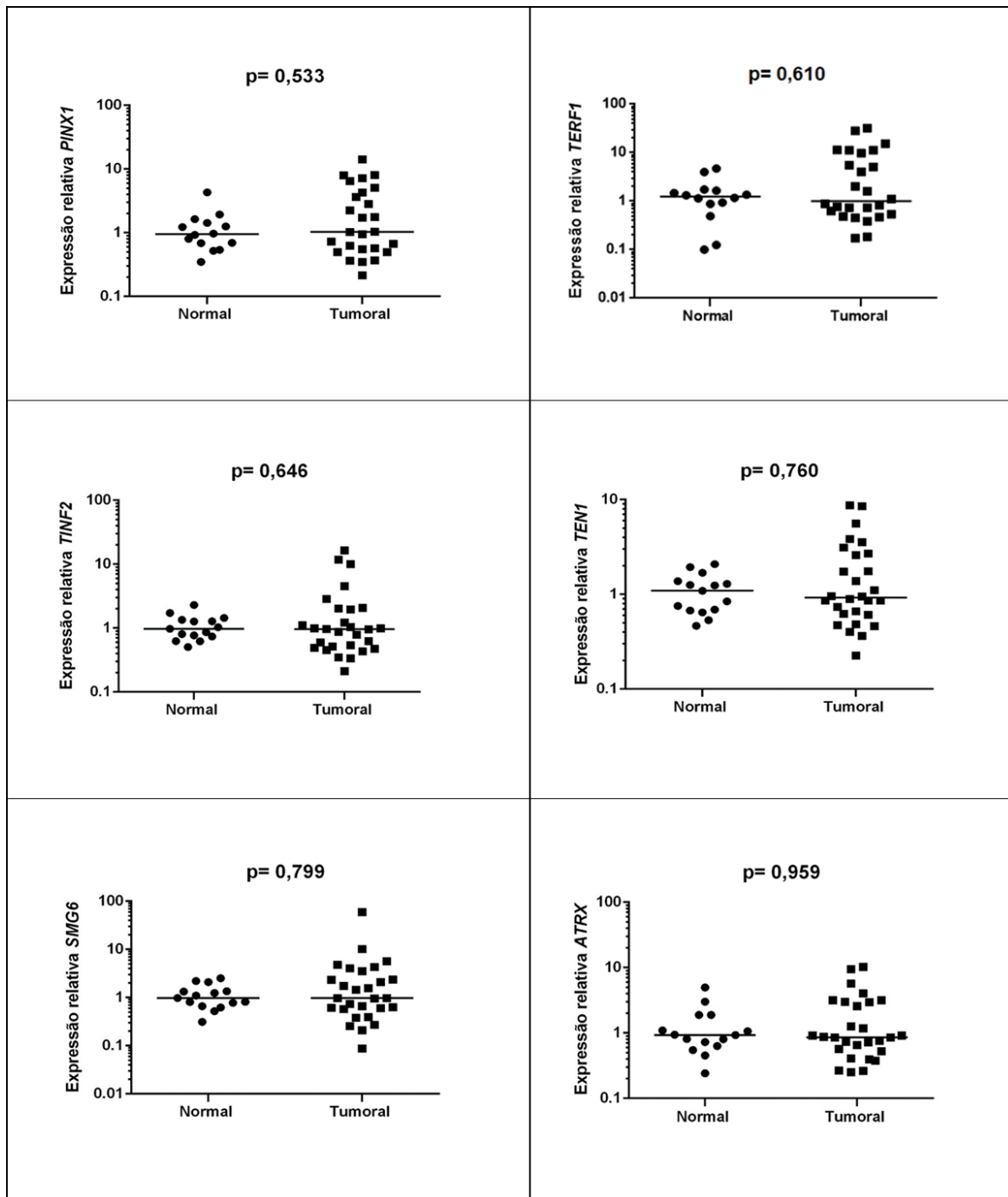
“continua”

“continuação”



“continua”

“continuação”



Nota: Gráficos de pontos, ilustrando os valores observados de expressão gênica relativa (log10- eixo y) em amostras tumorais (n=28) vs normais (n=15) (eixo x). A barra representa o ponto de equilíbrio da dispersão dos valores observados. ( $p < 0,05$ , Wilcoxon-Mann-Whitney, GraphPadPrism software versão 6).

Os dados apresentados revelaram que nas amostras de NSCLC, o gene *TERT*, que codifica o componente catalítico da telomerase, está altamente expresso em relação as

amostras de tecido pulmonar normal. Estes resultados são condizentes com os dados da literatura que demonstram que 85 a 90% dos tumores malignos expressam e reativam a telomerase (KIM et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG, 2000), incluindo o NSCLC (COUNTER et al., 1998; HSU et al., 2003; WU et al., 2003a; BRENNAN; HAINAUT; BOFFETTA, 2011; OSAKI et al., 2013; WEI; DEVILBISS; LIU, 2015).

Destaca-se neste estudo a expressão aumentada do gene *DKC1* em amostras de NSCLC. *DKC1* é um importante componente do complexo telomerase. A expressão aumentada de *DKC1* já foi verificada em diferentes tipos de tecido tumorais: carcinoma hepatocelular (LIU et al., 2012), próstata (SIERON et al., 2009), cólon (WITKOWSKA et al., 2010) e mama (MONTANARO et al., 2008), sugerindo que esta proteína possui um papel crítico na tumorigênese (PANERO et al., 2015). E Fernandez-Garcia et al. (2013) verificou que a expressão do gene *DKC1* estava elevada em várias linhagens celulares de câncer de pulmão (A549, H23, H157, H1299, H460 e H727). Adicionalmente usando modelo *in vitro*, o estudo identificou que células com aumento exógeno de expressão de *DKC1* possuíam uma maior taxa de sobrevivência em relação as células utilizadas como controle (sem expressão exógena de *DKC1*), quando tratadas com MST 312, droga inibidora da atividade de telomerase, sugerindo que alto nível de expressão de *DKC1* confere resistência ao encurtamento telomérico causado pela inibição da atividade de telomerase. A depleção de *DKC1* resultou em morte da cultura celular quando tratada com MST 312, sugerindo que a expressão de *DKC1* pode ter um papel crucial para a sobrevivência de células de câncer de pulmão mediante terapias moleculares que tem como alvo os componentes envolvidos com a manutenção dos telômeros (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2013). Os resultados obtidos na presente pesquisa e no estudo relatado por Fernandez-Garcia et al. (2013) mostraram que *DKC1* pode ter importância na manutenção telomérica em NSCLC.

Foi verificado também que os genes *RUVBL1* (*Pontin*) e *RUVBL2* (*Repetin*) apresentaram expressão elevada em NSCLC, nesta pesquisa. As ATPases *RUVBL1* e *RUVBL2* estão envolvidas em vários processos celulares, como: regulação do processo de transcrição, remodelamento da cromatina, mecanismos de reparo ao DNA, regulação do ciclo celular e biogênese do complexo telomerase (VENTEICHER et al., 2008; MAO; HOURY, 2017;). E pesquisas tem evidenciado um papel importante dessas proteínas no processo de oncogênese, sendo encontradas com expressão aumentada em vários tipos de cânceres, como: carcinoma hepatocelular (HAURIE et al., 2009; BERASAIN, 2010; RAYMOND et al., 2015; BREIG et al., 2017), colo retal (LAUSCHER et al., 2007, 2012;

MILONE et al., 2016), gástrico (LI et al., 2010; CUI et al., 2016), rins (REN et al., 2013; ZHANG et al., 2015) e leucemia mielóide (OSAKI et al., 2013; BREIG et al., 2014). E vários estudos, assim como o presente, tem demonstrado expressão dessas ATPases em câncer de pulmão, tanto do tipo histológico NSCLC (DEHAN et al., 2007; YUAN et al., 2016; VELMURUGAN et al., 2017), quanto SCLC (OCAK et al., 2014; URIBARRI et al., 2014). Conseqüentemente, essas ATPases vêm sendo apontadas como importantes biomarcadores para diagnóstico e prognósticos de vários tipos de cânceres incluindo o de pulmão (MAO; HOURY, 2017).

No presente estudo a expressão aumentada da *shelterin* POT1, verificada nas amostras de NSCLC, reforça a concepção que nas células tumorais os mecanismos de manutenção telomérica são acionados na tentativa de recuperar a estabilidade genômica perdida pelas células, pois POT1 é de fundamental importância para a proteção telomérica e recrutamento da enzima telomerase nos telômeros. Contudo, esse resultado contrapõe estudo anterior descrito por Lin et al. (2006) no qual não foi detectada alteração na expressão de *POT1* em pacientes NSCLC. Portadores de câncer de pulmão apresentam haplótipos SNPs em *POT1* que vem sendo associados com o risco de desenvolvimento da doença. O SNP rs10244817, por exemplo, foi encontrado em pacientes NSCLC chineses (HOSGOOD et al., 2009) e o SNP rs116895242 está associado ao câncer de pulmão em pessoas de origem européia, porém o efeito dessas mutações no comprometimento da estabilidade gênica permanece desconhecido (KARAMI et al., 2016). A expressão elevada de *POT1* é encontrada em outros tipos de cânceres, como por exemplo, no Mieloma Múltiplo (MM) e ela é associada a um prognóstico pobre dos pacientes. Em outros cânceres como Melanoma familiar, Glioma familiar e Leucemia Linfocítica Crônica são encontradas variantes de POT1 que prejudicam a proteção telomérica e que conferem um efeito de alongamento aos telômeros, efeito este que em combinação com aberrações induzidas por essas mutações favorecem a incidência tumoral (RAMSAY et al., 2013; ROBLES-ESPINOZA et al., 2014; SHI et al., 2014; BAINBRIDGE et al., 2015; MARTÍNEZ; BLASCO, 2015).

Já os genes *PINX1*, *TRF1* e *TRF2* não estão diferencialmente expressos nas amostras estudadas. Na literatura faltam dados sobre o perfil de expressão de *PinX1* em câncer de pulmão, contudo os dados sobre expressão das TRFs permanecem controversos. Conforme relatado, HSU et al. (2003) mostrou que *TRF1* e *TRF2* estão altamente expressos em amostras de pacientes com NSCLC, porém LIN et al. (2006)

detectou baixa expressão de *TRF1* e expressão não alterada de *TRF2* em células tumorais NSCLC em relação a células normais.

Contudo nas células de NSCLC estudadas foi possível verificar expressão aumentada de genes que codificam proteínas não *shelterins*, envolvidas com a maquinaria de reparo a danos nos telômeros como RAD51, RPA3 e BRCA2. Estes dados sugerem que os telômeros das células tumorais podem estar sofrendo reparo por recombinação homóloga, pois as proteínas RAD51 e RPA são fatores de recombinação homóloga, envolvidos principalmente com mecanismos de trocas de fragmentos entre cromátides irmãs (T-SCEs) (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). E a proteína BRCA2 atua como facilitadora para o acesso de RAD51 nos telômeros nas fases S e G2 do ciclo celular (BADIE et al., 2010).

RPA é um complexo heterotrimétrico formado por 3 constituintes: RPA1 (70 KDa), RPA2 (32KDa) e RPA3 (14KDa), com função na replicação, recombinação e reparo telomérico (WOLD, 1997; GILSON; GÉLI, 2007). O gene *RPA1* foi verificado com expressão aumentada em células mononucleadas de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM) em comparação com células de pacientes com Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), uma forma pré-maligna de MM (PANERO et al., 2015). Estudos encontraram expressão aumentada de *RPA1* em linfócitos de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (PONCET et al., 2008; HOXHA et al., 2014). Adicionalmente foi verificado expressão elevada de *RPA1* e *RPA2* em tumores de esôfago (DAHAI et al., 2013), colón (GIVALOS et al., 2007) e carcinoma de bexiga (LEVIDOU et al., 2011). A expressão elevada de *RPA1* foi associada a um prognóstico pobre dos pacientes com câncer de esôfago (DAHAI et al., 2013), assim como a expressão elevada de *RPA1* e *RPA2* foi relacionada a um prognóstico pobre nos pacientes com câncer de cólon (GIVALOS et al., 2007). Na literatura faltam dados sobre o perfil de expressão de *RPA* em câncer de pulmão e no presente estudo, como já mencionado, foi avaliada a expressão de *RPA3* em NSCLC que se mostrou com alta expressão nas células tumorais.

Alta expressão de *RAD51* tem sido relatada em diversos tipos de câncer, como: NSCLC, mama, cabeça e pescoço, pâncreas, leucemia, colorretal e frequentemente correlacionada a um prognóstico pobre dos pacientes (CHRISTODOULOPOULOS et al., 1999; MAACKKE et al., 2000a, 2000b; BREATHNACH et al., 2001; QIAO et al., 2005; SÖDERLUND et al., 2007; LI et al., 2017). E a expressão elevada de *RAD51* vem sendo associada também a uma maior resistência das células cancerosas de NSCLC a agentes quimioterápicos, como compostos contendo platina e gefitinibe (QIAO et al., 2005;

TAKENAKA et al., 2007; KO et al., 2008a), além de estar relacionada a resistência ao tratamento de leucemia e ao aumento da capacidade invasiva de câncer de mama (CHRISTODOULOPOULOS et al., 1999; MAACKE et al., 2000b). Grande parte dos fármacos anticancerígenos induzem dano ao DNA, levando a parada do ciclo celular ou morte das células, e por consequência a resistência das células cancerosas aos agentes terapêuticos está sendo associada ao aumento da eficácia dos mecanismos de reparo do DNA, que podem ser considerado como uma das principais barreiras para terapia do câncer (HOEIJMAKERS, 2001; SYNOWIEC et al., 2008). Corroborando com este fato, um estudo demonstrou que a sobrevida dos pacientes com NSCLC foi menor em pacientes com sistema de reparo mais eficiente (BOSKEN et al., 2002), e Lai et al. (1995), utilizando linhagens celulares NSCLC, mostrou que uma alta dose de cisplatina era necessária quando havia um aumento da atividade de reparo ao DNA. E RAD51 tem sido reportado por estar envolvido com o aumento da resistência das células ao tratamento contra o câncer justamente por ter um papel fundamental no sistema de reparo a danos ao DNA, reparo por recombinação homólogo (HENNING; STÜRZBECHER, 2003; TAKENAKA et al., 2007). Todos esses estudos incluindo os resultados obtidos no presente trabalho, no qual também foi verificado alta expressão de *RAD51* em tumores de NSCLC, mostraram a importância desse gene para o processo de oncogênese, principalmente, de NSCLC. Embora mais estudos sejam necessários, RAD51 tem um enorme potencial para ser considerado um marcador prognóstico em pacientes com NSCLC, sendo útil para identificar pacientes com maior risco de progressão tumoral e recorrência da doença, além de diagnosticar pacientes com maior resistência a quimioterápicos (QIAO et al., 2005; TAKENAKA et al., 2007; KO et al., 2008a, 2008b).

Os genes *DNMT3B* e *DNMT3A*, que codificam DNA metiltransferases responsáveis por metilação em regiões subteloméricas, mostraram expressão elevada nas amostras tumorais de NSCLC avaliadas no presente estudo. Estas proteínas exercem efeito regulatório na manutenção do tamanho dos telômeros, pois a depleção desses genes causa um alongamento telomérico aberrante (GONZALO et al., 2006). A expressão aumentada de *DNMTs* é verificada em vários tipos de cânceres, tais como leucemia mielóide, fígado, mama e cólon (ZHANG; XU, 2017). Relacionado a câncer de pulmão e *DNMTs*, um estudo que verificou que a depleção de *DNMT3A* em ratos levou à progressão do câncer de pulmão (GAO et al., 2011; ZHANG; XU, 2017). E por consequência especula-se que nas células NSCLC, avaliadas no presente trabalho, as *DNMTs* teriam um papel importante na manutenção telomérica e consequente

estabilidade genômica, devido à grande abundância que são detectadas (elevada expressão de *DNMT3A* e *DMT3B*)

A histona metiltransferase SUV39H1 exerce função na regulação do tamanho telomérico, na organização da heterocromatina e estabilidade genômica (GARCÍA-CAO et al., 2003). O presente estudo, no qual a expressão de *SUV39H1* se encontrou aumentada em células de NSCLC, fornece mais uma evidência da importância dessa proteína para o processo de oncogênese em NSCLC, pois Liu et al. (2015) demonstrou que a inibição de SUV39H1 por *chaetocin* (inibidor de histona metiltransferase) e silenciamento gênico leva a apoptose de células de NSCLC, evidenciando que nesse tipo de carcinoma, SUV39H1 pode atuar controlando processos de proliferação celular e apoptose. *SUV39H1* também apresentou expressão aumentada em gliomas (SPYROPOULOU et al., 2014) e está diretamente envolvida no desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (DI CROCE, 2002).

Portanto, as análises do presente estudo mostraram que genes envolvidos com a manutenção telomérica estão com expressão elevada em células tumorais de NSCLC comparado com as células pulmonares normais, sugerindo que esses genes podem estar envolvidos no processo de desenvolvimento de NSCLC. Mais especificamente é constatado que nesse conjunto tumoral estudado, há predominância de tumores telomerase positivo, evidenciados, pela alta expressão do gene *TERT* (principal componente do complexo telomerase) e expressão elevada de genes como, *DKC1*, *RUVBL1* e *RUVBL2*, envolvidos diretamente com a manutenção do complexo telomerase. E que telômeros dessas células tumorais estão sofrendo ação massiva da maquinaria de reparo, principalmente por recombinação homóloga, pois os genes *RAD51*, *RPA3* e *BRCA2* foram detectados com expressão elevada.

#### 5.1.1 Investigação de alterações na expressão de RNAs teloméricos não codantes em amostras de indivíduos diagnosticados com NSCLC

Adicionalmente, foi investigado se havia expressão diferencial dos RNAs envolvidos com a manutenção dos telômeros em amostras de NSCLC. Foi averiguada a expressão relativa de *TERC* e dos longos RNAs não codantes *TERRA 15q* (transcrito telomérico do braço longo do cromossomo 15), *TERRA 1q-2q-10q-13q* (transcritos teloméricos dos braços longos dos cromossomos 1, 2, 10 e 13) e mais recentemente foi incluído na pesquisa o *TERRA 20q* (transcrito telomérico do braço longo do cromossomo 20). Dados recentes da literatura mostraram que apenas o transcrito originado do *locus*

cromossômicos 20q tem características de TERRA, resultado obtido após a deleção, via *CRISPR-Cas 9*, dos 18 *loci* subteloméricos antes propostos como expressores de TERRA evidenciou que somente a deleção do *locus* 20q resultou em completa ausência de expressão de TERRA e como consequência foi verificado alta taxa de perda de fragmentos teloméricos e indução de resposta massiva da maquinaria de reparo, afetando a viabilidade das células. Em consequência, se concluiu que o TERRA originado do *locus* cromossômico 20q está envolvido com a manutenção e integridade dos telômeros (MONTERO J.J., LÓPEZ DE SILANES I., GRAÑA O., 2016).

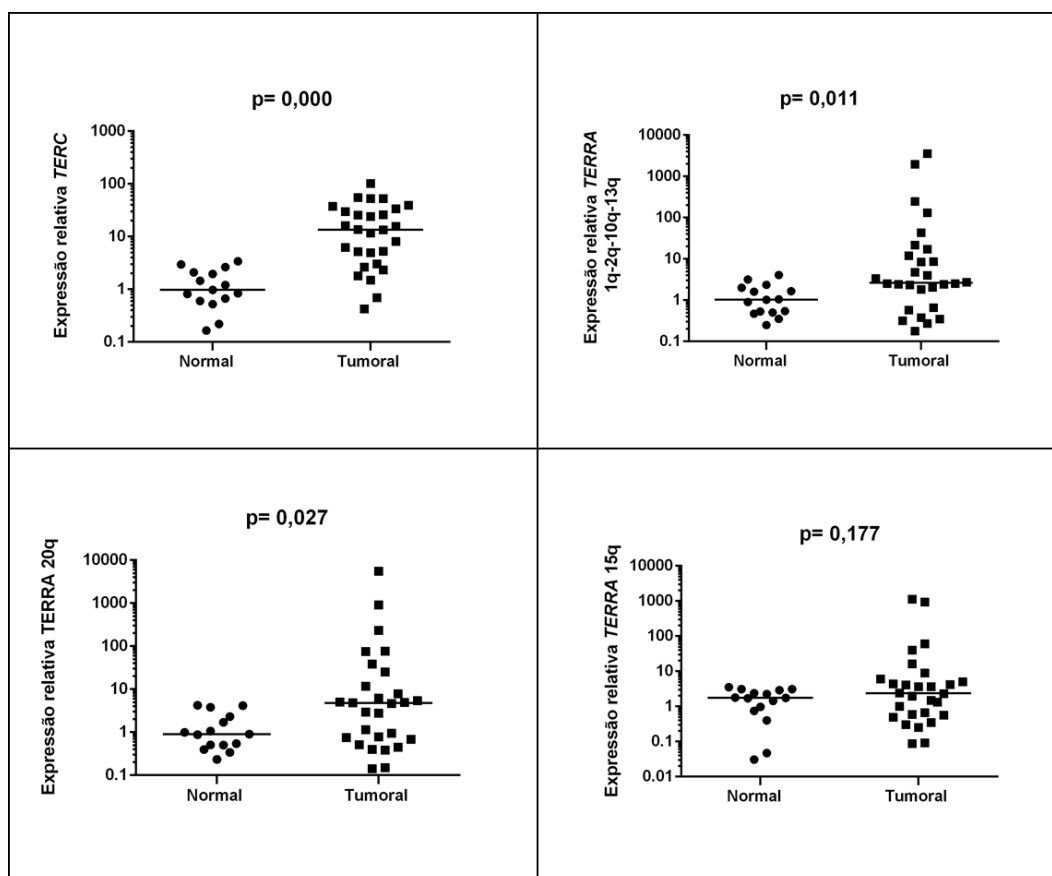
Análises não pareadas entre grupos amostrais (amostras tumorais vs normais), utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon – Mann – Whitney estão elucidadas nas Tabela 5 e Figura 7 abaixo.

**Tabela 5 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em amostras de NSCLC**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERC</i>	7012	<i>Telomerase RNA component</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,977 13,410	<b>0,000</b>
<i>TERRA</i> <i>1q-2q-10q-13q</i>	*	<i>Telomeric repeat-containing RNA, cromossome ends 1q-2q-10q-13q</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,029 2,620	<b>0,011</b>
<i>TERRA 20q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 20q</i>	Normal (15) Tumoral (28)	0,901 4,736	<b>0,027</b>
<i>TERRA 15q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 15q</i>	Normal (15) Tumoral (28)	1,756 2,358	0,177

Nota: Teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (tumoral versus normal).  $p < 0,05$ . (\*) Sem informação

**Figura 7 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) dos RNAs teloméricos não codantes em tumor vs normal**



Nota: Gráficos de pontos, ilustrando os valores observados de expressão gênica relativa (log10- eixo y) em amostras tumorais (n=28) vs normais (n=15) (eixo x). A barra representa o ponto de equilíbrio da dispersão dos valores observados. ( $p < 0,05$ , Wilcoxon- Mann- Whitney, GraphPadPrism software versão 6)

Essas análises mostram que há expressão aumentada de *TERC* ( $p=0,000$ ) nas amostras tumorais em relação às normais, reforçando que entre os tumores analisados há predominância de tumores telomerase positivo, já que o RNA (*TERC*) é parte fundamental do complexo enzimático telomerase (GILSON; GÉLI, 2007; LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012). Expressão desregulada de *TERC* já foi identificada em outros estudos (YOKOI et al., 2003; HSU et al., 2004). E *TERC* é determinado como um alvo provável de ampliações em 3q26 encontradas em NSCLC, podendo constituir um biomarcador nesse carcinoma (YOKOI et al., 2003). Também se detectou alteração na expressão dos RNAs longos não codantes *TERRA 1q-2q-10q-13q* ( $p=0,011$ ) e *TERRA 20q* ( $p=0,027$ ) em amostras de tumor em relação as normais. Este resultado também evidencia que os lncTERRA podem estar envolvidos na manutenção telomérica em NSCLC, sobretudo pela alta expressão do TERRA originado do *locus* cromossômico 20q,

importante para a integridade dos telômeros e viabilidade celular (MONTERO; LÓPEZ DE SILANES; GRAÑA; 2016).

## **5.2 Investigação de alterações na expressão de genes codificantes de proteínas teloméricas nos subtipos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC**

Averiguar possíveis diferenças no perfil de expressão gênica telomérica entre os subtipos histológicos de NSCLC é de suma importância, visto que LUAD e LUSC divergem em relação a alterações em vias e processos moleculares (BREATHNACH et al., 2001; LARSEN; MINNA, 2011; SHTIVELMAN et al., 2014). Para esse propósito, neste trabalho foram feitas análises independentes para tumores LUAD e LUSC. Foram executadas análises não pareadas entre os grupos amostrais (tecido tumoral vs normal), utilizando o teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* e os resultados encontram-se detalhados nas Tabelas 6 e 7. As tabelas estão organizadas na ordem do menor para o maior valor de p.

**Tabela 6 - Expressão relativa de genes envolvidos com os telômeros em adenocarcinoma pulmonar (LUAD)**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERT</i>	7015	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,064 36,370	<b>0,001</b>
<i>DNMT3B</i>	1789	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,008 5,842	0,051
<i>RAD51</i>	5888	<i>RAD51 recombinase</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,073 4,003	0,097
<i>SMG6 (Est1)</i>	23293	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,970 0,562	0,143
<i>TERF1 (TRF1)</i>	7013	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,900 0,543	0,205
<i>ATRX (RAD54)</i>	546	<i>ATRX, chromatin remodeler</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,790 0,601	0,242
<i>TINF2</i>	26277	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,951 0,716	0,283
<i>DNMT3A</i>	1788	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,915 1,307	0,329
<i>PINX1</i>	54984	<i>PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,011 0,624	0,329
<i>RPA3</i>	6119	<i>Replication protein A3</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,958 1,858	0,380
<i>POT1</i>	25913	<i>Protection of telomeres 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,107 1,126	0,380
<i>TEN1</i>	100134934	<i>TEN1, CST complex subunit</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,215 0,839	0,435
<i>STAG2</i>	10735	<i>Stromal antigen 2</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,653 0,612	0,495
<i>DAXX</i>	1616	<i>Death domain associated protein</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,075 0,638	0,558
<i>RUVBL1 (Pontin)</i>	8607	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,899 1,409	0,626
<i>RUVBL2</i>	10856	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,983 1,495	0,626
<i>TERF2 (TRF2)</i>	7014	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,806 1,051	0,626
<i>TNKS2</i>	80351	<i>Tankyrase 2</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,015 0,766	0,696
<i>DKC1</i>	1736	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,949 1,343	0,770
<i>MRE11</i>	4361	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,933 0,809	0,845
<i>BRCA2</i>	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,949 1,071	0,845
<i>HSP90AA1</i>	3320	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,879 0,818	0,922
<i>RTEL1</i>	51750	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,610 1,070	0,922
<i>SUV39H1</i>	6839	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,866 1,095	1,000

Nota: Teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (tumoral vs. normal).  $p < 0,05$ .

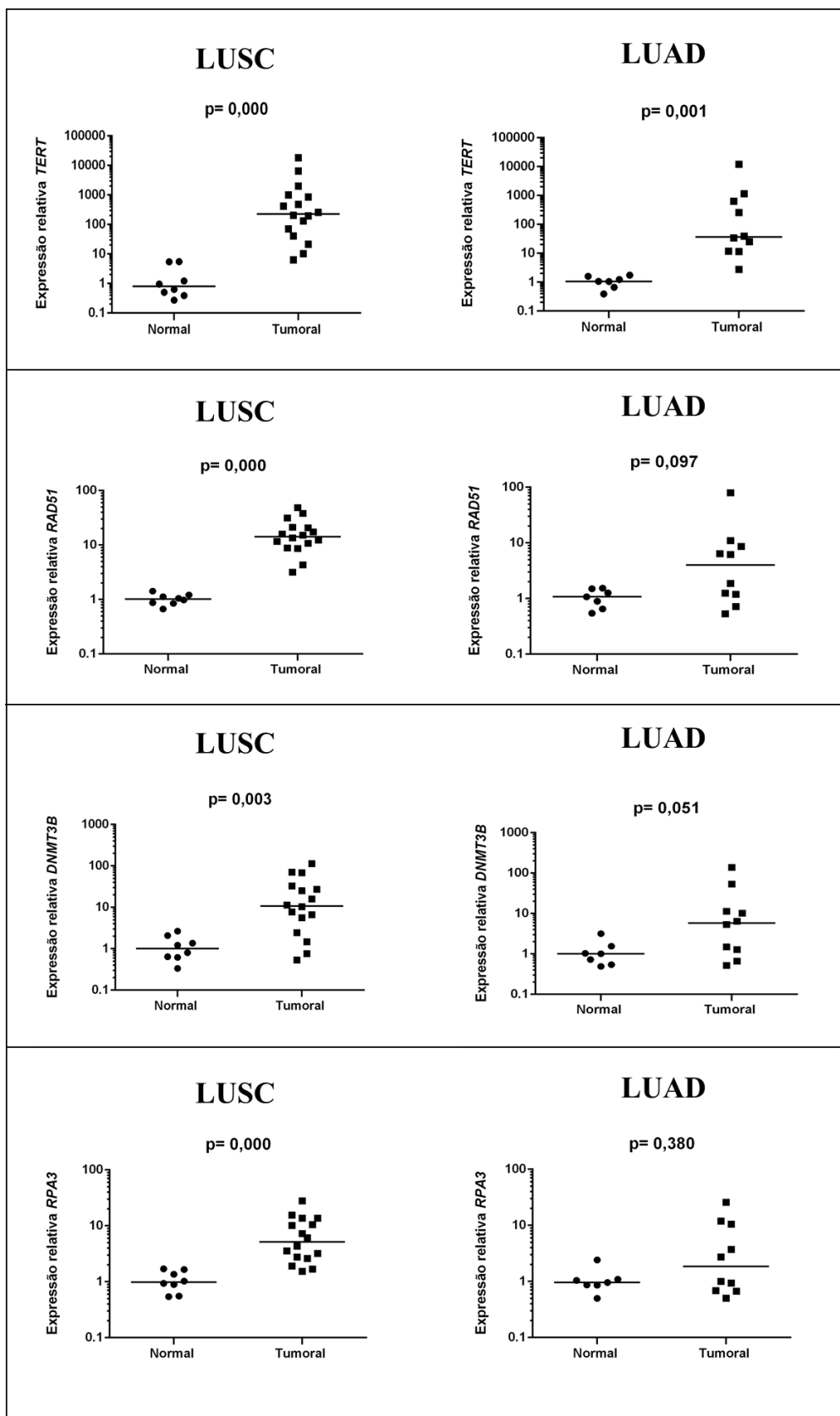
**Tabela 7 - Expressão relativa de genes envolvidos com os telômeros em carcinoma pulmonar de células escamosas (LUSC)**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERT</i>	7015	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Normal (8)	0,799	<b>0,000</b>
			Tumoral (16)	228,877	
<i>RAD51</i>	5888	<i>RAD51 recombinase</i>	Normal (8)	1,015	<b>0,000</b>
			Tumoral (16)	14,237	
<i>SUV39H1</i>	6839	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	Normal (8)	0,871	<b>0,000</b>
			Tumoral (16)	3,982	
<i>RPA3</i>	6119	<i>Replication protein A3</i>	Normal (8)	0,982	<b>0,000</b>
			Tumoral (16)	5,184	
<i>BRCA2</i>	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	Normal (8)	1,104	<b>0,000</b>
			Tumoral (16)	8,657	
<i>DKC1</i>	1736	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	Normal (8)	0,936	<b>0,001</b>
			Tumoral (16)	3,296	
<i>RUVBL1 (Pontin)</i>	8607	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	Normal (8)	1,008	<b>0,002</b>
			Tumoral (16)	4,815	
<i>DNMT3B</i>	1789	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	Normal (8)	1,012	<b>0,003</b>
			Tumoral (16)	10,753	
<i>RUVBL2</i>	10856	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	Normal (8)	0,829	<b>0,008</b>
			Tumoral (16)	2,499	
<i>MRE11</i>	4361	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	Normal (8)	0,871	<b>0,010</b>
			Tumoral (16)	2,769	
<i>HSP90AA1</i>	3320	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	Normal (8)	1,150	<b>0,012</b>
			Tumoral (16)	2,295	
<i>DAXX</i>	1616	<i>Death domain associated protein</i>	Normal (8)	0,900	<b>0,017</b>
			Tumoral (16)	2,221	
<i>POT1</i>	25913	<i>Protection of telomeres 1</i>	Normal (8)	0,895	<b>0,037</b>
			Tumoral (16)	1,839	
<i>DNMT3A</i>	1788	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	Normal (8)	1,082	<b>0,043</b>
			Tumoral (16)	3,563	
<i>TERF1 (TRF1)</i>	7013	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	Normal (8)	1,428	0,101
			Tumoral (16)	4,599	
<i>TERF2 (TRF2)</i>	7014	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>	Normal (8)	1,076	0,101
			Tumoral (16)	3,093	
<i>TNKS2</i>	80351	<i>Tankyrase 2</i>	Normal (8)	1,053	0,198
			Tumoral (16)	1,769	
<i>SMG6 (Est1)</i>	23293	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	Normal (8)	0,914	0,221
			Tumoral (16)	1,684	
<i>STAG2</i>	10735	<i>Stromal antigen 2</i>	Normal (8)	0,825	0,245
			Tumoral (16)	1,522	
<i>PINX1</i>	54984	<i>PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1</i>	Normal (8)	0,884	0,332
			Tumoral (16)	1,666	
<i>TEN1</i>	100134934	<i>TEN1, CST complex subunit</i>	Normal (8)	0,936	0,358
			Tumoral (16)	1,269	
<i>ATRX (RAD54)</i>	546	<i>ATRX, chromatin remodeler</i>	Normal (8)	1,009	0,358
			Tumoral (16)	1,208	
<i>RTEL1</i>	51750	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	Normal (8)	0,966	0,606
			Tumoral (16)	1,311	
<i>TINF2</i>	26277	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	Normal (8)	0,879	0,903
			Tumoral (16)	0,982	

Nota: Teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (tumoral versus normal).  $p < 0,05$ .

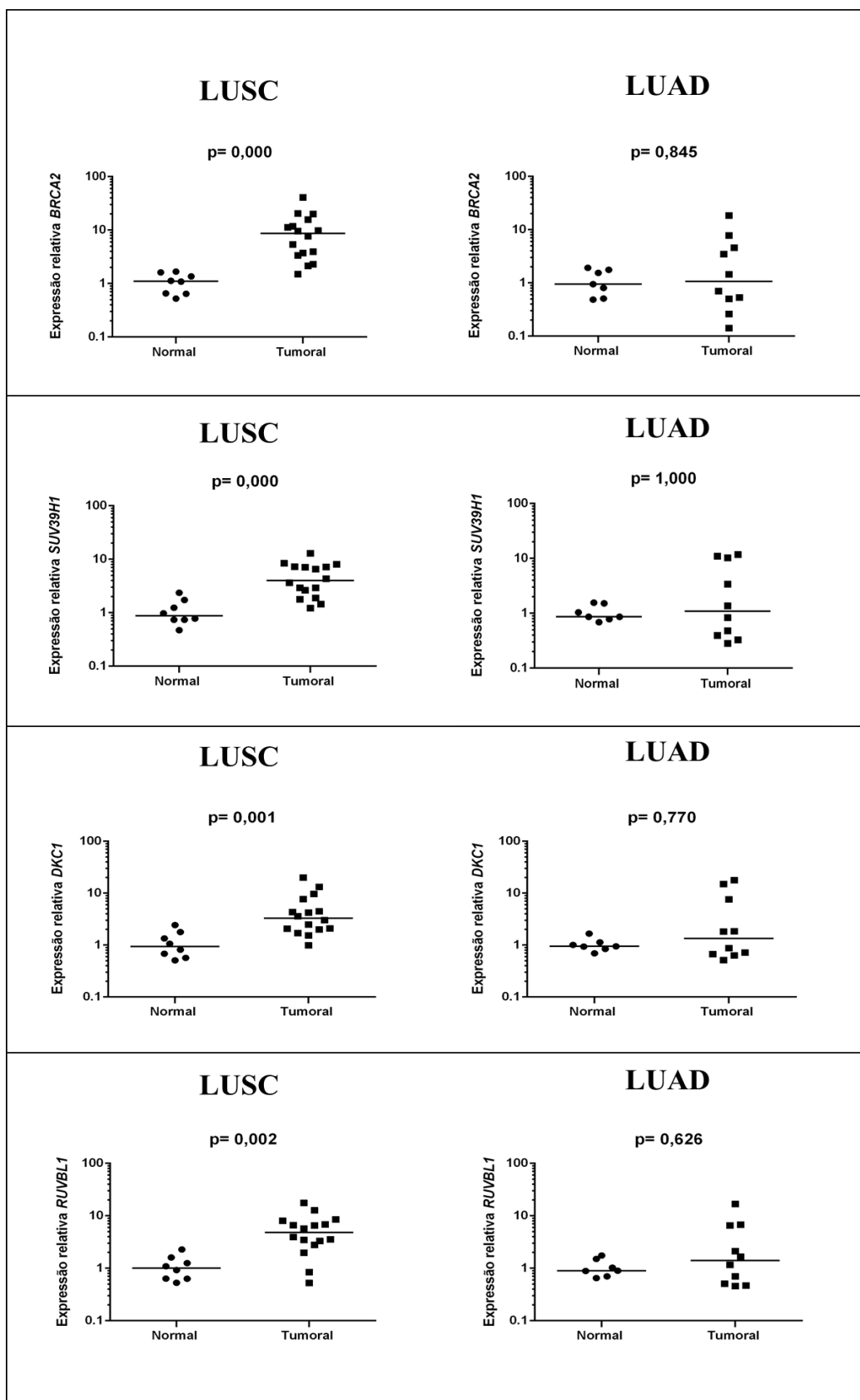
A Figura 8 evidencia as diferenças entre o perfil de expressão gênica dos subtipos histológicos LUAD e LUSC. E podemos verificar os valores observados de expressão relativa em cada amostra.

Figura 8 - Gráficos representativos da expressão relativa (log10) dos genes teloméricos nos diferentes grupos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC



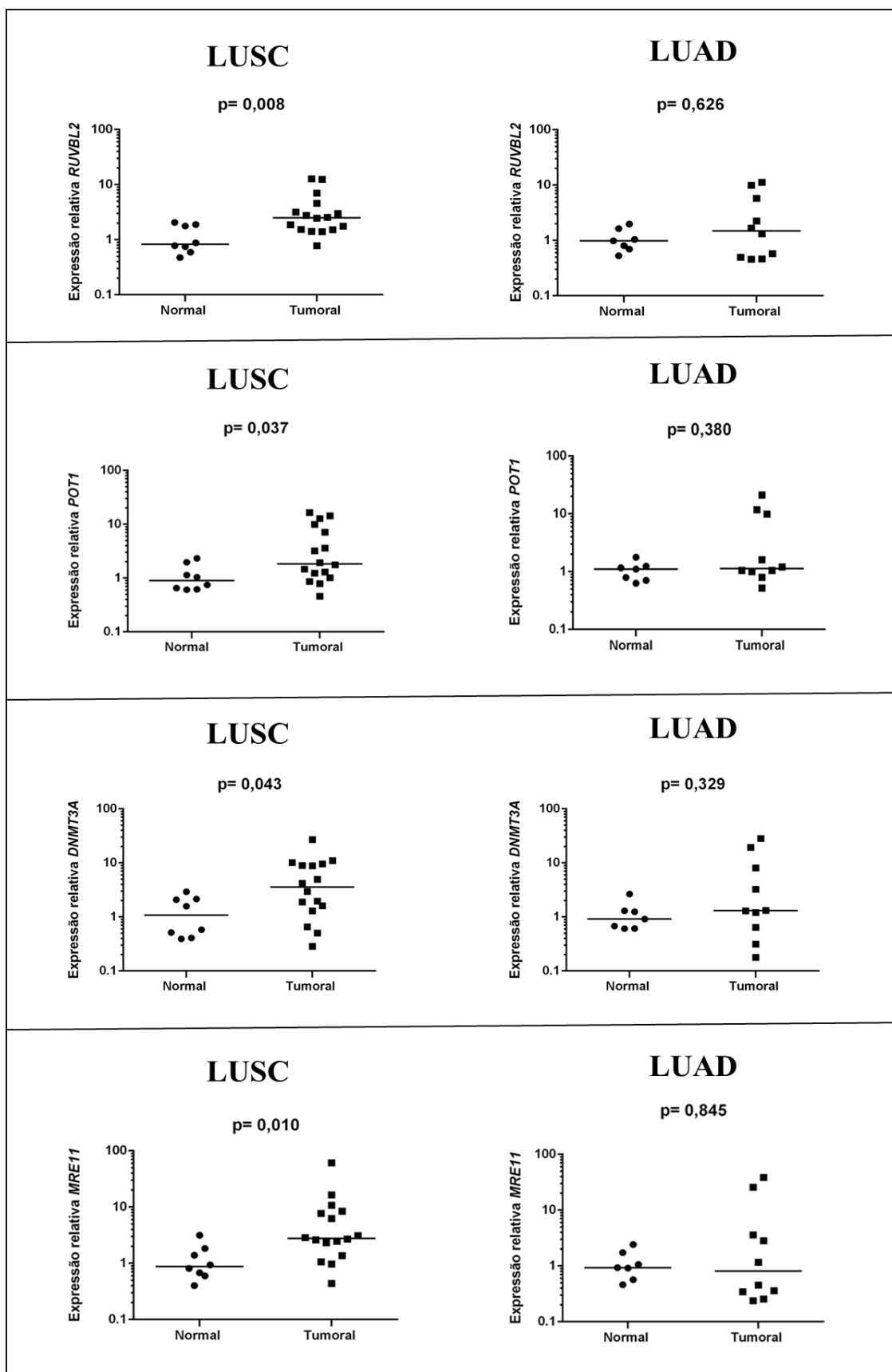
“continua”

“continuação”



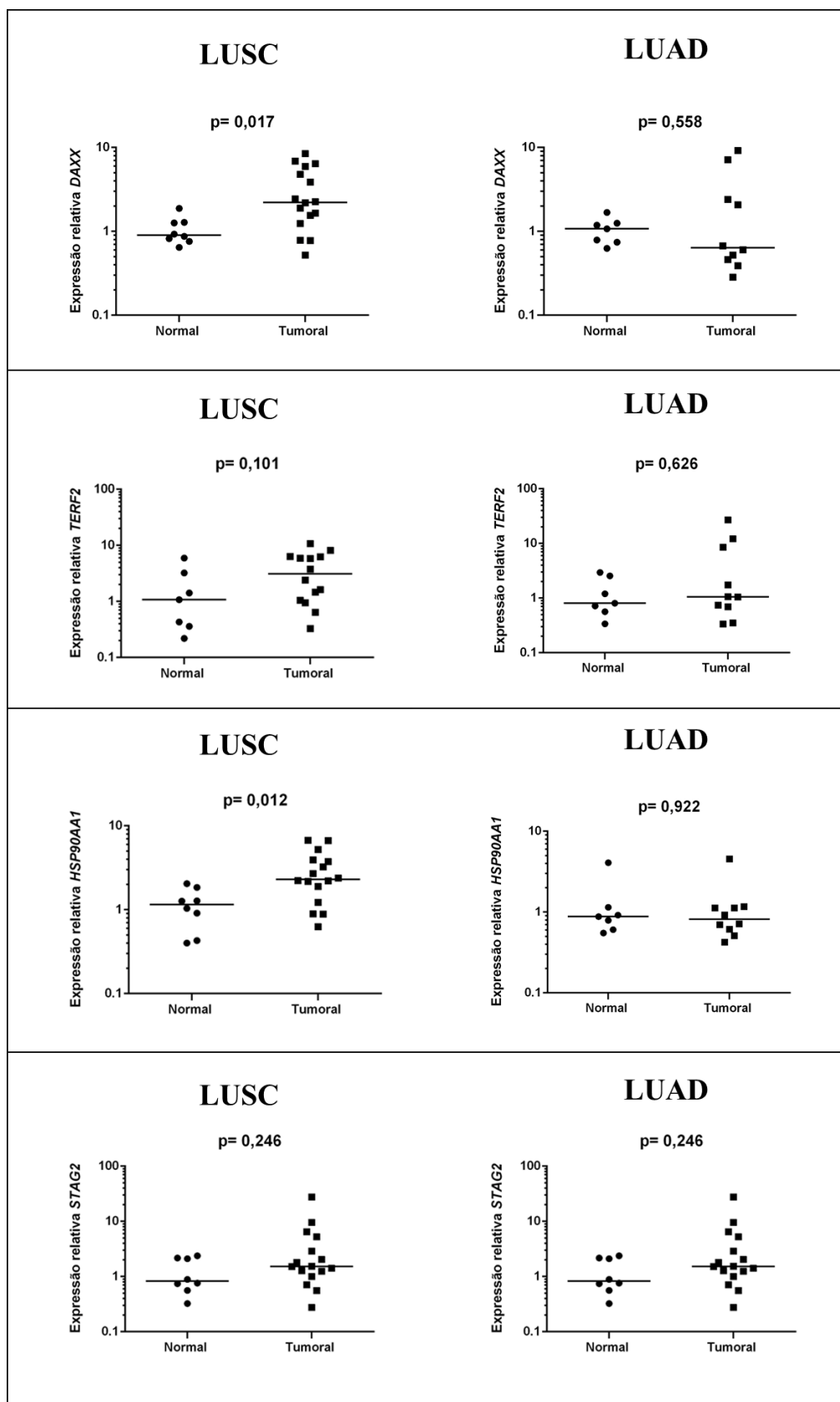
“continua”

“continuação”



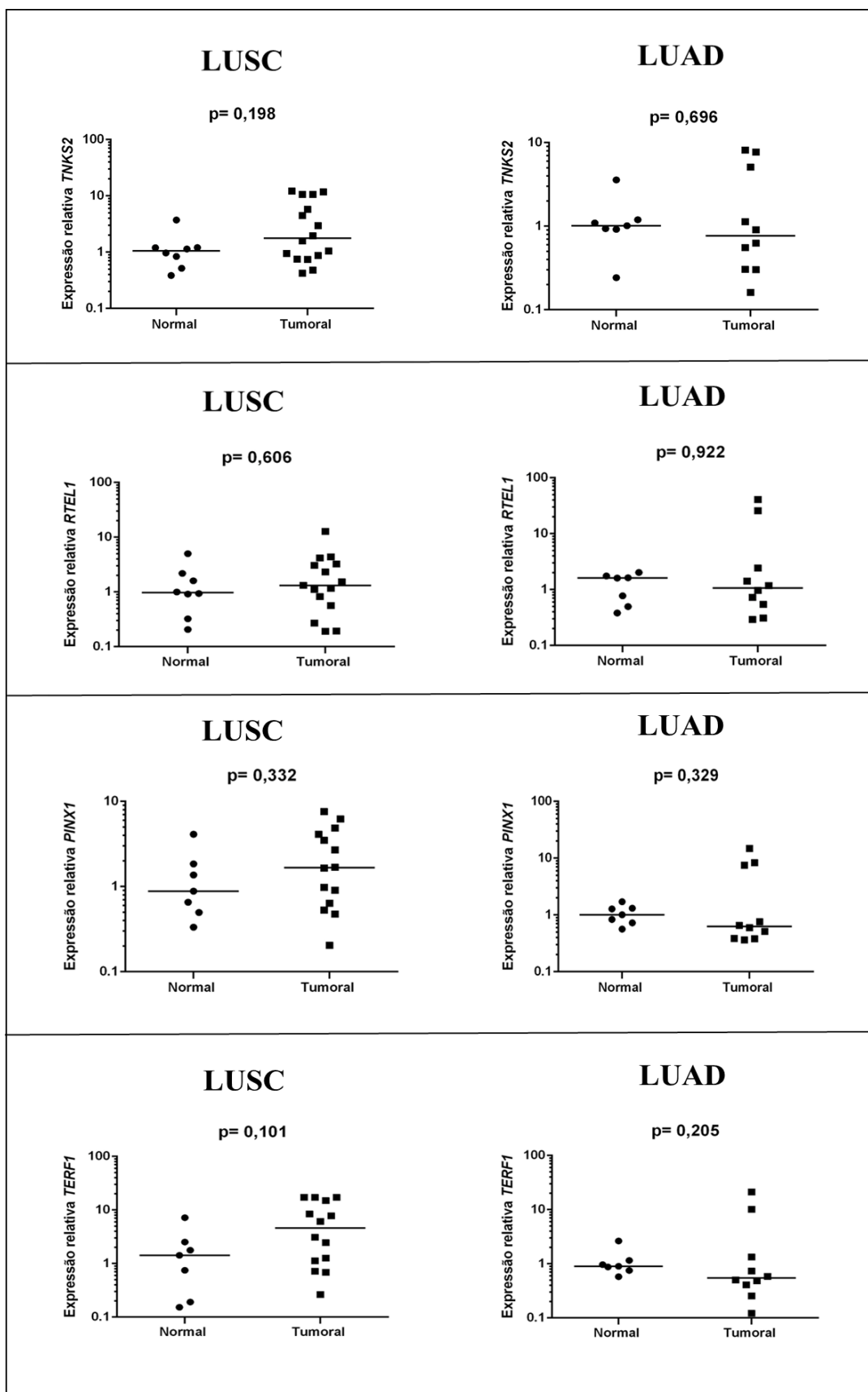
“continua”

“continuação”



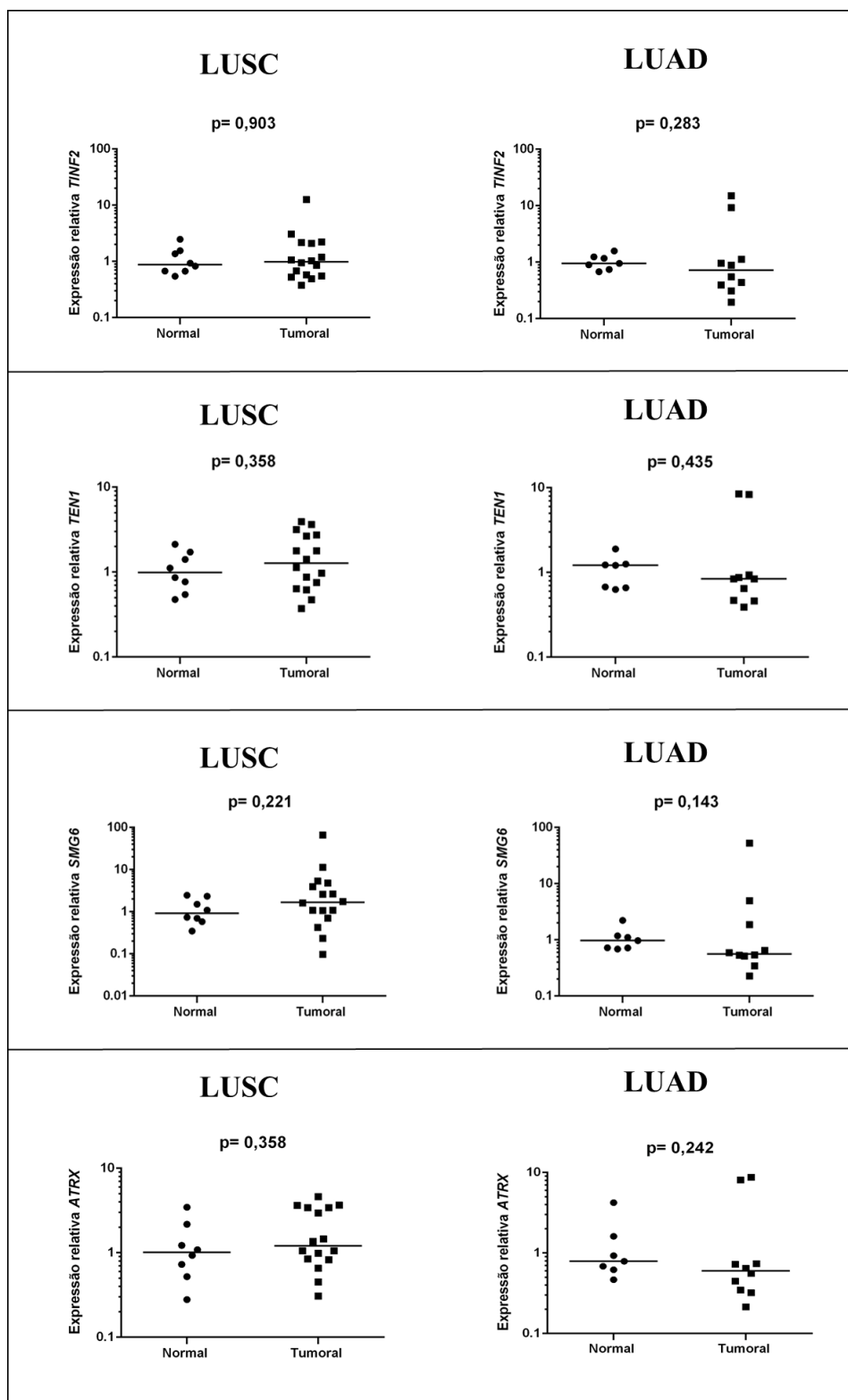
“continua”

“continuação”



“continua”

“continuação”



Nota: Gráficos de pontos, ilustrando os valores observados de expressão gênica relativa (log10- eixo y) em amostras tumorais vs normais (eixo x), sendo amostras de 10 de pacientes diagnosticados com o subtipo LUAD (10 amostras tumorais e 7 amostras normais) e amostras de 16 pacientes com o subtipo LUSC (16 amostras tumorais e 8 normais). A barra representa o ponto de equilíbrio da dispersão dos valores observados. ( $p < 0,05$ , Wilcoxon-Mann-Whitney, GraphPadPrism software versão 6).

Em suma, as análises revelaram que *TERT*, foi o único gene que apresentou expressão relativa aumentada em ambos os subtipos histológicos, LUSC ( $p= 0,0000$ ) e LUAD ( $p= 0,001$ ) (Figura 8). Os genes *RAD51*, *DNMT3B*, *RPA3*, *BRCA2*, *SUV39H1*, *DKC1*, *RUVBL1*, *RUVBL2*, *POT1*, *DNMT3A* e *MRE11*, que apresentaram expressão aumentada quando foram feitas análises considerando o conjunto amostral NSCLC, foram detectados com expressão aumentada somente nas amostras tumorais do subtipo LUSC, não estando diferencialmente expressos em LUAD. Adicionalmente, os genes *HSP90AA1* e *DAXX* que não foram encontrados desregulados considerando conjunto amostral de NSCLC, foram encontrados com aumento da expressão em LUSC, com ( $p= 0,012$ ) e ( $p=0,017$ ) respectivamente. Na literatura faltam dados sobre o perfil de expressão de *DAXX* em LUSC. HSPs (*heat shock protein*) são classificadas em famílias, segundo o peso molecular que apresentam, e HSP90 (90-kDa) é encontrada em grande abundância nas células, apresentando 5 isoformas: as citoplasmáticas Hsp90a e Hsp90b, GRP94 (*glucose related protein 94*) presente no retículo endoplasmático, a isoforma mitocondrial TNF (*tumor necrosis fator*) e a proteína TRAP1 (*receptor-associated protein 1*) (SREEDHAR et al., 2004). Há carência de estudos que avaliaram a expressão de *HSP90AA1* em células de câncer de pulmão, porém a isoforma HSP90b foi identificada com expressão elevada em tumores de NSCLC, associada a uma baixa sobrevida dos pacientes (KIM et al., 2015). Adicionalmente, o gene *HSP90b* estava com expressão aumentada e associada a estágios avançados de tumores de pacientes com câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) (BIAOXUE et al., 2012). Foi encontrada também elevada expressão das isoformas GRP94 e TRAP1 em SCLC (WANG et al., 2005; LEE et al., 2015). E como verificado, o presente estudo detectou a isoforma Hsp90a em grande abundância nas células de LUSC (elevada expressão do gene *HSP90AA1*), evidenciando que as HSP90s podem estar relacionadas ao desenvolvimento de câncer de pulmão e podem ser úteis como marcadores prognósticos, já que em geral a alta expressão dessas proteínas estão associadas a baixa sobrevida e estágios avançados da doença. Ressaltando que as HSP90 atuam nos telômeros, auxiliando na regulação da atividade, estabilidade e localização do complexo telomerase (COLLINS, 2006).

Em conclusão, foi constatado que no conjunto tumoral estudado há grande diferença quanto ao perfil de expressão dos genes relacionados à manutenção dos telômeros nos subtipos histológicos LUSC e LUAD, evidenciando que os telômeros e suas proteínas podem ter um papel maior no processo de oncogênese em LUSC quando comparado a LUAD. É importante ressaltar que há uma grande carência em alvos

moleculares específicos em LUSC. A grande maioria, senão todos os alvos e tratamentos moleculares existentes são para pacientes com o subtipo LUAD, havendo necessidade de se descobrir alterações específicas em LUSC e como mostrado nos resultados aqui apresentados, pode ser que essas alterações estejam nos genes associados a manutenção dos telômeros, visto a grande diferença encontrada, entre o perfil de expressão desses genes entre os subtipos LUSC e LUAD.

### 5.2.1 Investigação de alterações na expressão de RNAs teloméricos não codantes nos subtipos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC

Para investigar possíveis influências dos subtipos histológicos nos perfis de expressão dos RNAs teloméricos não codantes estudados, foram realizadas análises não pareadas, teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, subdividindo-se o grupo amostral NSCLC em LUAD e LUSC. A Figura 9 mostra as diferenças observadas quanto ao perfil de expressão desses RNAs nos dois subtipos histológicos.

As Tabelas 8 e 9 evidenciam os valores de mediana e p encontrados nas análises.

**Tabela 8 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em adenocarcinoma pulmonar (LUAD)**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERC</i>	7012	<i>Telomerase RNA component</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,070 2,772	0,143
<i>TERRA</i> <i>1q-2q-10q-13q</i>	*	<i>Telomeric repeat-containing RNA, cromossome ends 1q-2q-10q-13q</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,105 1,630	0,696
<i>TERRA 20q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 20q</i>	Normal (7) Tumoral (10)	0,889 2,059	0,558
<i>TERRA 15q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 15q</i>	Normal (7) Tumoral (10)	1,218 1,351	0,558

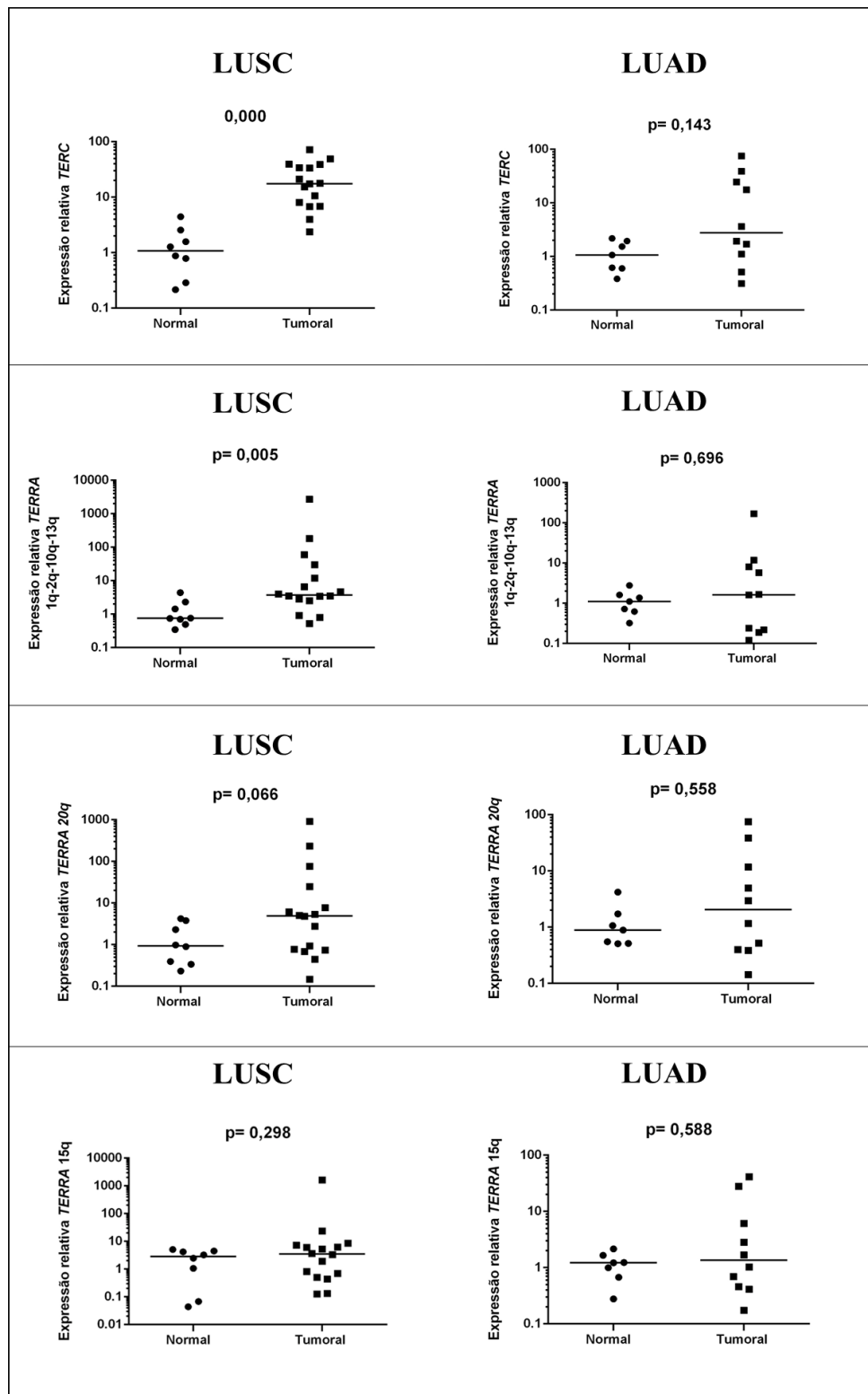
Nota: Teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (tumoral versus normal).  $p < 0,05$ . (\*) Sem informação.

**Tabela 9 - Expressão relativa de RNAs teloméricos não codantes em carcinoma pulmonar de células escamosas (LUSC)**

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Amostra (n)	Mediana	Valor de p
<i>TERC</i>	7012	<i>Telomerase RNA component</i>	Normal (8) Tumoral (16)	1,078 17,544	<b>0,000</b>
<i>TERRA</i> <i>1q-2q-10q-13q</i>	*	<i>Telomeric repeat-containing RNA, cromossome ends 1q-2q-10q-13q</i>	Normal (8) Tumoral (16)	0,753 3,755	0,005
<i>TERRA 20q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 20q</i>	Normal (8) Tumoral (16)	0,939 4,897	0,066
<i>TERRA 15q</i>	*	<i>Telomeric repeat- containing RNA, cromossome end 15q</i>	Normal (8) Tumoral (16)	2,856 3,479	0,298

Nota: Teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (tumoral versus normal).  $p < 0,05$ . (\*) Sem informação.

**Figura 9 - Gráficos representativos da expressão gênica relativa (log10) de RNAs teloméricos não codantes nos diferentes grupos histológicos de NSCLC: LUAD e LUSC**



Nota: Gráficos de pontos, ilustrando os valores observados de expressão gênica relativa (log10- eixo y) em amostras tumorais vs normais (eixo x), sendo amostras de 10 de pacientes diagnosticados com o subtipo LUAD (10 amostras tumorais e 7 amostras normais) e amostras de 16 pacientes com o subtipo LUSC (16 amostras tumorais e 8 normais). A barra representa o ponto de equilíbrio da dispersão dos valores observados. (p<0,05, Wilcoxon- Mann- Whitney, GraphPadPrism software versão 6).

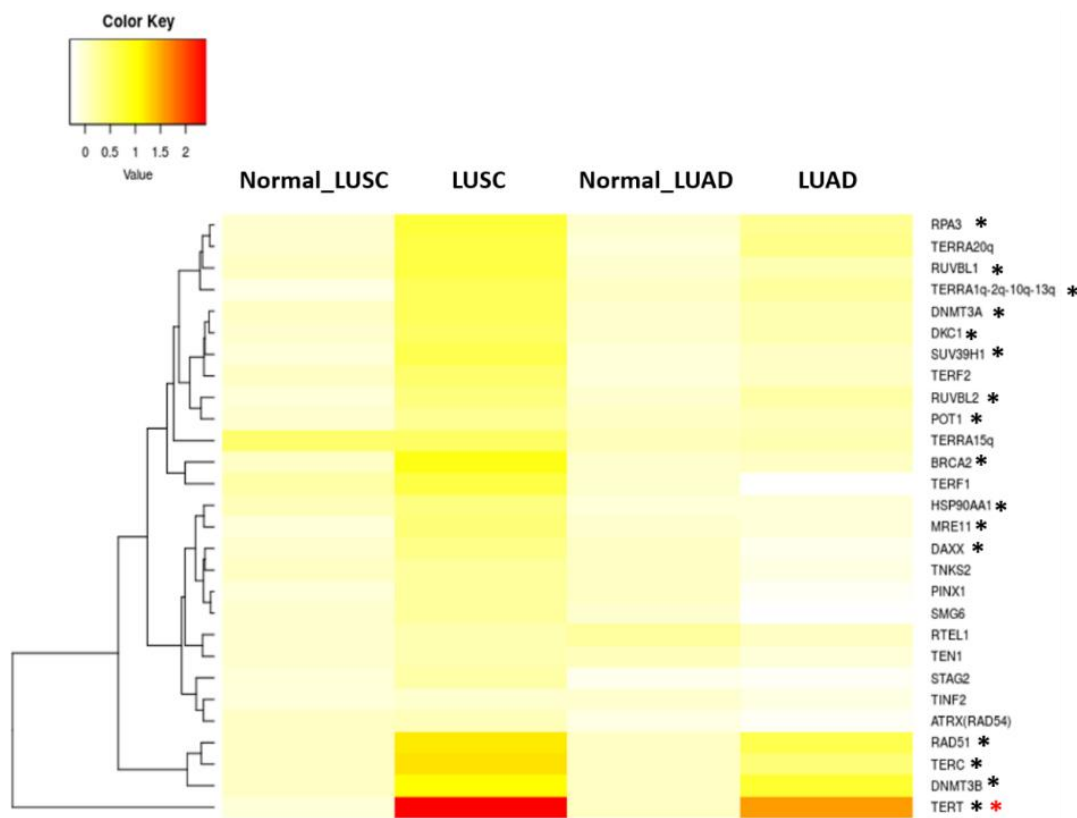
Como verificado, em LUAD não há expressão diferencial de nenhum RNA estudado, porém em tumores LUSCs há expressão aumentada de *TERC* ( $p=0,000$ ) e *TERRA 1q-2q-10q-13q* ( $p=0,005$ ) em relação as amostras normais. *TERRA 20q*, o qual apresentou expressão elevada no grupo amostral de NSCLC, não foi identificado diferencialmente expresso nos subtipos LUAD ( $p=0,588$ ) e LUSC ( $p=0,066$ ). Porém, é necessário ressaltar que o valor de  $p=0,066$  em LUSC é considerado como um valor limítrofe para o nível de significância considerado ( $p \leq 0,05$ ), indicando que pode haver uma tendência a essas células tumorais terem expressão elevada de *TERRA20q* (mediana= 4,897) em relação às normais (mediana=0,939), porém o baixo número amostral pode estar afetando essa análise. Ressaltando que Monteiro al. (2016), mostrou que apenas o transcrito originado do *locus* cromossômico 20q tem características de *TERRA*, sendo o *TERRA 20q* importante para a manutenção e integridade dos telômeros, e viabilidade celular.

Esses resultados destacam a expressão aumentada de *TERC* em LUSC, mas não em LUAD e assim confirmam dados obtidos por SODER et al. (1998), que sugerem que *TERC* pode ser diferencialmente regulado durante o processo de oncogênese nos subtipos histológicos de carcinoma pulmonar. E YOKOI et al. (2003), também, detectou alta expressão de *TERC* associada a linhagens celulares do subtipo de LUSC. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho e em estudos prévios sugerem que *TERC* pode ser considerado um importante biomarcador em LUSC.

### 5.2.2 Diferenças nos perfis de expressão dos genes associados aos telômeros em amostras de pacientes com LUSC e LUAD

Os resultados da análise de RT-qPCR mostraram diferenças entre os perfis de expressão dos genes associados aos telômeros em LUSC vs. LUAD (Figura 10). No *heatmap*, para cada gene avaliado (linhas), foram plotados os valores das medianas ( $\log_{10}$ ) dos valores de expressão relativa encontrados em cada grupo amostral (coluna).

Figura 10 - Heatmap do perfil de expressão gênica em tumores dos subtipos LUSC e LUAD



Nota: Gráfico mostrando os valores de mediana (log10) de expressão relativa para cada grupo amostral (colunas): tecidos normais adjacentes aos tumores do subtipo LUSC (n=8, 1ª coluna), tumores do tipo LUSC (n=16, 2ª coluna), normais adjacentes aos tumores do subtipo LUAD (n=7, 3ª coluna) e tumores do subtipo LUAD (n=10, 4ª coluna) para cada gene avaliado (linhas). Cores avermelhadas correspondem aos maiores valores de mediana e os tons esbranquiçados aos menores valores. (\*) Genes diferencialmente expressos (tumor vs normal) para amostras de pacientes diagnosticados com o subtipo LUSC e (\*) genes diferencialmente expressos (tumor vs normal) para amostras de pacientes com subtipo LUAD, com base nas análises não pareadas e não paramétricas (*Wilcoxon-Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ ). Gráfico desenvolvido no software R (versão 3.4.1).

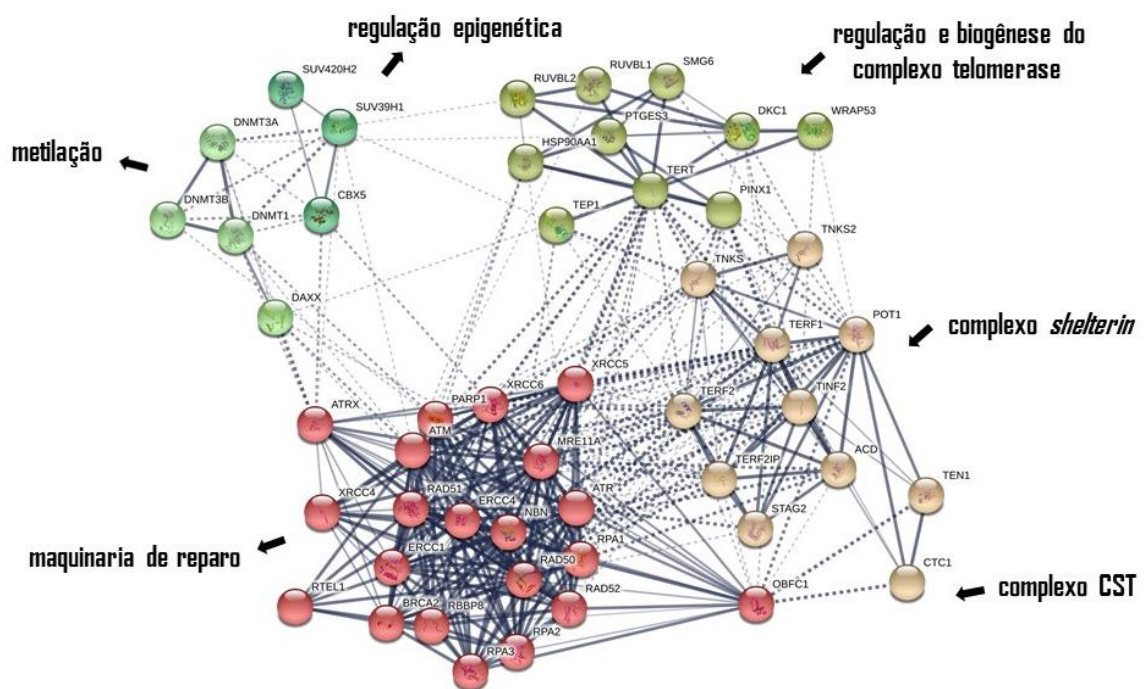
As medianas dos valores de expressão gênica em LUSC foram maiores (colorações em tons mais fortes) comparado com os valores das medianas da expressão gênica em LUAD, sendo que ambos os subtipos tumorais apresentaram altos valores de mediana para os genes *TERT*, *TERC*, *RAD51*, *DNMT3B*.

Os conjuntos amostrais referentes aos tecidos normais adjacentes ao tumor (ambos de LUSC e LUAD) apresentaram valores de mediana baixos e similares (tons esbranquiçados). Foram realizadas análises não pareadas e não paramétricas de *Wilcoxon-Mann-Whitney* para testar se as medianas observadas eram iguais ou diferentes entre os grupos dessas amostras. Para todos os genes, os resultados mostraram que não há diferença significativa de expressão entre os grupos normais adjacentes ( $p > 0,05$ ).

### 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

Nas etapas 5.4 e 5.5 foram analisados genes envolvidos tanto com a maquinaria clássica dos telômeros (complexo *shelterin* e telomerase) quanto associados a maquinaria de reparo a danos nos telômeros (reparo por recombinação homóloga e por junção de pontas não homólogas). Todos os genes analisados estão descritos no Anexo 5 e a rede de interação proteica pode ser visualizada na Figura 11.

Figura 11 - Rede de interação de proteínas envolvidas com a manutenção dos telômeros



Nota: Rede de interação proteica construída pelo software String versão 10.5.

### 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

Neste estudo, foi analisado o transcrito de 7 amostras tumorais de pacientes com LUAD e 7 tecidos pulmonares histologicamente normais, dos mesmos pacientes, tratados no Hospital A.C. Camargo, SP. O objetivo foi comparar os perfis de expressão

de genes teloméricos com os resultados obtidos via RT-qPCR, do grupo amostral de pacientes tratados no Hospital das Clínicas de Botucatu.

Neste caso, os pacientes avaliados, eram na maioria do sexo masculino (71%), possuíam idade superior a 65 anos ao serem diagnosticados com a doença (71%) e entre eles 86% eram tabagistas – Tabela 10.

**Tabela 10- Perfil clínico e histopatológico dos pacientes do Hospital AC. Camargo diagnosticados com LUAD**

<b>Pacientes (n)</b>	<b>7</b>	<b>%</b>
<b>Tipo Histológico</b>		
Adenocarcinoma	7	100%
<b>Sexo</b>		
Feminino	2	29%
Masculino	5	71%
<b>Idade</b>		
≤ 65 anos	2	29%
> 65 anos	5	71%
<b>Tabagismo</b>		
Sim	6	86%
Não	1	14%

Nas amostras do subtipo LUAD foram identificados com expressão aumentada, *Fold Change* (FC) com valor  $\geq 1$ , os genes *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *BRCA2* *DKC1* e *RUVBL2*, em relação as normais adjacentes ( $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$ ). E o gene *EST1A* apresentou  $FC = -1,19$ , evidenciando expressão diminuída nas células tumorais em relação às normais. Esses resultados estão organizados na Tabela 11 de acordo com os valores de FC, apresentados em ordem decrescente

**Tabela 11 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com LUAD, análise de transcrito utilizando dados de RNA- Seq**

<b>Gene (símbolo)</b>	<b>Ensembl ID</b>	<b>Gene (nome)</b>	<b>log2FC</b>	<b>Valor de p</b>	<b>FDR</b>
<i>TERT</i>	ENSG00000164362	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	4,482	0,000	0,005
<i>RAD51</i>	ENSG00000051180	<i>RAD51 recombinase</i>	2,810	0,000	0,000
<i>DNMT3B</i>	ENSG00000088305	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	2,572	0,000	0,000
<i>DKC1</i>	ENSG00000130826	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	1,336	0,000	0,000
<i>BRCA2</i>	ENSG00000139618	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	1,286	0,000	0,008
<i>RUVBL2</i>	ENSG00000183207	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	1,184	0,000	0,006
<i>EST1A (SMG6)</i>	ENSG00000070366	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	-1,189	0,000	0,004

Nota: FC, fold change; FDR, False Discovery Rate

Como verificado, Tabela 11, nas amostras do subtipo LUAD há alta expressão de telomerase (*TERT*) e não foi identificada expressão diferencial de *TERC*, validando os resultados obtidos com as amostras do subtipo LUAD, avaliadas via RT-qPCR (item 5.2) e confirmando dados de estudos prévios, no qual mostraram que a expressão elevada de *TERC* em NSCLC pode estar associada somente ao subtipo histológico LUSC (SODER et al., 1998; WU et al., 2016). Contudo, foi detectada expressão elevada dos genes *DNMT3B*, *RUVBL2*, *RAD51*, e *BRCA2* nas amostras de LUAD (dados de RNA-Seq), resultado que não foi identificado nas análises via RT-qPCR, nas quais esses genes apresentaram expressão elevada no conjunto amostral de NSCLC, mas associadas apenas ao subtipo LUSC. Ressaltando que nas amostras do subtipo LUAD analisadas previamente via RT-qPCR (item 5.2), somente o gene *TERT* estava diferencialmente expresso. Adicionalmente o gene *EST1A*, componente do complexo telomerase, apresentou expressão diminuída nas amostras de LUAD (dados de RNA-Seq). As diferenças encontradas nas análises relatadas podem ter ocorrido devido a uma possível variabilidade genética entre os indivíduos ou ao emprego de técnicas diferentes para a quantificação de expressão gênica.

Conforme identificado no transcrito das amostras do subtipo LUAD, genes envolvidos com a regulação e biogênese do complexo telomerase, estavam diferencialmente expressos: *DKC1*, *RUVBL2* e *EST1A*. A expressão elevada do gene *DKC1*, importante para a montagem do complexo TERT/TERC, também foi relatado em diversos tipos de cânceres, inclusive em diversas linhagens celulares de câncer de pulmão, mostrando ter papel fundamental na manutenção dos telômeros nessas células cancerosas (MONTANARO et al., 2008; SIERON et al., 2009; WITKOWSKA et al., 2010; ALAWI; LIN, 2011; LIU et al., 2012; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2013; PANERO et al., 2015). O gene *RUVBL2* mostrou elevada expressão nas amostras tumorais do subtipo LUAD, sendo que a ATPase *RUVBL2* está envolvida na biogênese do complexo telomerase e vários estudos têm demonstrado que essa proteína pode ter um importante papel no processo de oncogêneses, sendo identificada com expressão aumentada em vários tipos de cânceres, incluindo de pulmão do tipo NSCLC, e por consequência vem sendo apontada como um importante biomarcador para diagnóstico e prognóstico (MAO; HOURY, 2017). Portanto os resultados obtidos na presente pesquisa reforçam o envolvimento de *RUVBL2* no processo de oncogênese de NSCLC. O gene que codifica

a proteína EST1A, foi identificado com expressão diminuída nas células tumorais do subtipo LUAD (Tabela 11). EST1A é um componente do complexo telomerase que interage diretamente com TERT, sendo essencial para alongação dos telômeros (COLLINS, 2006). E Reichenbach et al. (2003) mostrou que a expressão elevada de *EST1A* em células *Hela* causou desproteção telomérica e fusões de terminais cromossômico. Porém, faltam estudos que esclareçam o efeito da expressão diminuída de EST1A, verificada no presente estudo em células de câncer de pulmão.

Outro gene que apresentou expressão aumentada em LUAD, foi o *DNMT3B* que codifica uma DNA metiltransferase, requerida em eventos genômicos de metilação *de novo*, essencial para a manutenção de padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento embrionário e de células germinativas, e nos telômeros é responsável por metilar DNA em regiões subteloméricas, estando também envolvida com controle de expressão de RNAs longos não codificadores do tipo TERRA, transcritos a partir de regiões subteloméricas ( GONZALO et al., 2006; FARNUNG et al., 2012). A expressão aumentada de DNMTs é verificada em vários tipos de cânceres tais como leucemia mielóide, fígado, mama e cólon (ZHANG; XU, 2017). Porém, faltam estudos que mostrem o perfil de expressão de *DNMT3B* em NSCLC.

Nas amostras do subtipo LUAD, também foi identificada expressão elevada dos genes *RAD51* e *BRCA2* que codificam proteínas envolvidas com a maquinaria de reparo por recombinação homóloga nos telômeros (BADIE et al., 2010; LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). E como relatado, *RAD51* vem sendo apontada como um provável marcador prognóstico em pacientes com NSCLC, sendo eficaz para a identificação de pacientes com maior risco de progressão tumoral e recorrência da doença, além de auxiliar no diagnóstico de pacientes com maior resistência a quimioterápicos (QIAO et al., 2005; TAKENAKA et al., 2007; KO et al., 2008a, 2008b)

Concluindo, nas amostras do subtipo LUAD, análise de transcrito utilizando dados de RNA-Seq, há grande abundância de TERT em relação as amostras de tecido pulmonar normal, indicando que esses tumores são telomerase positivo. Fato evidenciado também, pela expressão desregulada dos genes *DKC1*, *EST1A* e *RUVBL2*, envolvidos com a regulação e manutenção do complexo telomerase. E na tentativa das células cancerosas recuperarem a estabilidade genômica e manterem a viabilidade celular, há ação da maquinaria de reparo a danos nos telômeros, pois foi identificado expressão elevada do gene *RAD51*, envolvido com mecanismos homólogos de reparo, assim como a detecção de *BRCA2* em grande abundância, essa proteína atua como facilitadora para

o acesso de RAD51 nos telômeros. Resultados que estão de acordo com dados estabelecidos na literatura sobre a importância da telomerase e de fatores de reparo na imortalização celular e manutenção da viabilidade das células cancerosas ( KIM et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000; SUNAMI et al., 2014; CALADO, 2014; GIARDINI et al., 2014).

### 5.5 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)

Com o objetivo de comparar o perfil de expressão de genes envolvidos com a maquinaria telomérica em NSCLC de pacientes brasileiros, com dados da população mundial, foram realizadas análises do transcrito de amostras de pacientes com NSCLC, disponíveis no banco de dados público *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Neste caso foram analisadas amostras de 85 pacientes (85 amostras tumorais e 85 amostras normais adjacentes, dos mesmos pacientes). Foram realizadas análises separadas para amostras de pacientes diagnosticados com o subtipo LUAD - 43 pacientes (43 amostras tumorais e 43 amostras normais) e amostras dos pacientes com o subtipo LUSC- 42 pacientes (42 amostras tumorais e 42 amostras normais). Em ambos os grupos houve predominância de indivíduos do sexo feminino (53,6 %) com idade maior que 65 anos quando diagnosticado com a doença (53,8%), e tabagistas (69,3%) (Tabela 12).

**Tabela 12 - Características dos pacientes com NSCLC, cujos dados de transcrito foram retirados do banco de dados público: *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)**

Pacientes (n= 85)	%
<b>Sexo</b>	
Masculino	46.4
Feminino	53.6
<b>Idade(anos)</b>	
≤65	46.8
>65	53.8
<b>Tabagismo</b>	
Sim	69.3
Não	30.7
<b>Tipo histológico</b>	
Carcinoma de células escamosas	49
Adenocarcinoma	51

### 5.5.1 Análise da expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do TCGA- LUSC

Nesta análise, 40 genes foram identificados com expressão desregulada, considerando o nível de significância de  $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$  (Tabela 13). Destacando 14 genes que apresentaram expressão aumentada nas células tumorais em relação as normais FC com valor  $\geq 1$ , *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1*, *RUVBL1*, *BRCA2*, *RBBP8*, *PARP1*, *SUV39H1*, *DNMT3A*, *SUV420H2*, *DNMT1*, *ATR* e *RUVBL2*. A Tabela 13 está organizada de acordo com os valores de FC, apresentados em ordem decrescente.

**Tabela 13 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com subtipo tumoral LUSC, cujos dados foram extraídos do TCGA**

Gene (símbolo)	GeneID	Gene (nome)	log2FC	Valor de p	FDR
<i>TERT</i>	ENSG00000164362.17	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	5,253	0,000	0,000
<i>RAD51</i>	ENSG00000051180.15	<i>RAD51 recombinase</i>	3,576	0,000	0,000
<i>DNMT3B</i>	ENSG00000088305.17	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	3,260	0,000	0,000
<i>DKC1</i>	ENSG00000130826.14	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	1,901	0,000	0,000
<i>RUVBL1 (Pontin)</i>	ENSG00000175792.10	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	1,676	0,000	0,000
<i>BRCA2</i>	ENSG00000139618.13	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	1,620	0,000	0,000
<i>RBBP8 (CTLP)</i>	ENSG00000101773.15	<i>RB binding protein 8, endonuclease</i>	1,604	0,000	0,000
<i>PARP1</i>	ENSG00000143799.11	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>	1,438	0,000	0,000
<i>SUV39H1</i>	ENSG00000101945.15	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	1,377	0,000	0,000
<i>DNMT3A</i>	ENSG00000119772.15	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	1,343	0,000	0,000
<i>KMT5C (SUV420H2)</i>	ENSG00000133247.12	<i>Lysine methyltransferase 5C</i>	1,276	0,000	0,000
<i>DNMT1</i>	ENSG00000130816.13	<i>DNA methyltransferase 1</i>	1,238	0,000	0,000
<i>ATR</i>	ENSG00000175054.13	<i>ATR serine/threonine kinase</i>	1,037	0,000	0,000
<i>RUVBL2 (Reptin)</i>	ENSG00000183207.11	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	1,033	0,000	0,000
<i>RPA3</i>	ENSG00000106399.10	<i>Replication protein A3</i>	0,934	0,000	0,000
<i>RPA1</i>	ENSG00000132383.10	<i>Replication protein A1</i>	0,926	0,000	0,000
<i>XRCC6 (Ku 70)</i>	ENSG00000196419.11	<i>X-ray repair cross complementing 6</i>	0,763	0,000	0,000
<i>PTGES3</i>	ENSG00000110958.14	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	0,759	0,000	0,000
<i>HSP90AA1</i>	ENSG00000080824.17	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	0,751	0,000	0,000
<i>MRE11</i>	ENSG00000202922.11	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	0,714	0,000	0,000
<i>RTEL1</i>	ENSG00000258366.6	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	0,677	0,000	0,000
<i>XRCC5 (ku 80)</i>	ENSG00000079246.14	<i>X-ray repair cross complementing 5</i>	0,663	0,000	0,000
<i>POT1</i>	ENSG00000128513.13	<i>Protection of telomeres 1</i>	0,659	0,000	0,000
<i>CBX5</i>	ENSG00000094916.12	<i>Chromobox 5</i>	0,657	0,000	0,000
<i>RAD52</i>	ENSG00000002016.15	<i>RAD52 homolog, DNA repair protein</i>	0,566	0,000	0,000
<i>ACD (TPP1)</i>	ENSG00000102977.12	<i>ACD, shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor</i>	0,549	0,000	0,000
<i>DAXX</i>	ENSG00000204209.9	<i>Death domain associated protein</i>	0,529	0,000	0,000
<i>ERCC1</i>	ENSG00000012061.14	<i>ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit</i>	0,489	0,000	0,000
<i>XRCC4</i>	ENSG00000152422.14	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>	0,427	0,000	0,000
<i>TERF1 (TRF1)</i>	ENSG00000147601.12	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	0,418	0,000	0,000
<i>WRAP53 (TCAB1)</i>	ENSG00000141499.15	<i>WD repeat containing antisense to TP53</i>	0,403	0,000	0,001
<i>STAG2</i>	ENSG00000101972.17	<i>Stromal antigen 2</i>	0,383	0,000	0,000
<i>TNKS</i>	ENSG00000173273.14	<i>Tankyrase</i>	0,371	0,000	0,000
<i>PINX1</i>	ENSG00000254093.7	<i>PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1</i>	0,370	0,003	0,009
<i>ERCC4</i>	ENSG00000175595.13	<i>ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit</i>	0,334	0,003	0,007
<i>TINF2 (TIN2)</i>	ENSG00000092330.14	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	-0,382	0,000	0,000
<i>TERF2IP (RAP1)</i>	ENSG00000166848.5	<i>TERF2 interacting protein</i>	-0,505	0,000	0,000
<i>CTC1</i>	ENSG00000178971.12	<i>CST telomere replication complex component 1</i>	-0,625	0,000	0,000
<i>STN1</i>	ENSG00000107960.9	<i>STN1, CST complex subunit</i>	-0,776	0,000	0,000

Nota: FC, fold change; FDR, False Discovery Rate.

Pode-se verificar que assim como no grupo amostral de tumores do subtipo LUSC de pacientes brasileiros (expressão gênica analisada por RT-qPCR, item 5.2) há uma

grande quantidade de genes envolvidos com a manutenção dos telômeros que apresentaram expressão desregulada nesse subtipo histológico de câncer de pulmão, indicando que os telômeros e proteínas envolvidas nesta maquinaria podem estar envolvidos na oncogênese de LUSC. Da mesma maneira que no grupo amostral de LUSC de pacientes brasileiros: *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1*, *RUVBL1*, *BRCA2*, *SUV39H1*, *DNMT3A*, *RUVBL2* foram identificados com expressão aumentada, validando esses dados. Além desses, os genes *RBBP8*, *PARP1*, *SUV420H2*, *DNMT1* e *ATR* foram identificados com expressão aumentada nas amostras do subtipo LUSC, cujos dados foram extraídos do TCGA, porém não foram investigados no conjunto amostral de LUSC analisado via RT-qPCR (item 5.2).

DNMT1 é uma DNA metil transferases e assim como DNMT3B, é responsável pela metilação em regiões subtelo méricas e regulação do tamanho telomérico (GONZALO et al., 2006), como já citado, expressão elevada de *DNMTs* é verificada em vários tipos de cânceres como leucemia mielóide, fígado, mama e cólon (ZHANG; XU, 2017). As proteínas PARP1 e RBBP8 (CtIP) são de fundamental importância para o mecanismo de reparo não homólogo nos telômeros pela via alt-NHEJ (*alternative non-homologous end joining*) (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). E como relatado, ATR é uma quinase de sinalização para danos no DNA do tipo quebras de fita única e nos telômeros regula o recrutamento da telomerase para o alongamento dos terminais de cromossomos ( TONG et al., 2015; LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016). Outro gene que estava com expressão aumentada é o que codifica a Lysine methyltransferase 5C (SUV420H2), uma histona envolvida com a regulação epigenética dos telômeros e que implica na regulação do tamanho telomérico (GARCÍA-CAO et al., 2003). Embora se reconheça a importância da mesma no metabolismo celular, faltam estudos que esclareçam o papel desta proteína nas células cancerosas.

Os genes *RPA3*, *HSP90AA1*, *MRE11*, *POT1* e *DAXX* que apresentaram expressão aumentada nos tumores do subtipo LUSC de pacientes brasileiros (expressão gênica analisada por RT-qPCR), foram detectados diferencialmente expressos ( $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$ ) nos dados de RNA-Seq provenientes do TCGA, porém apresentaram  $FC < 1$ , o que significa pouca diferença na expressão quando se compara células tumorais e células normais.

*TERC*, que foi identificado altamente expresso em LUSC de pacientes brasileiros (dados de RT-qPCR), não foi detectado com expressão alterada nos dados de RNA-Seq provenientes do TCGA. Entretanto, estudos prévios identificaram a expressão aumentada

de *TERC* associada ao subtipo LUSC, e sugerem que *TERC* pode ser diferencialmente regulado durante o processo de oncogênese nos diferentes subtipos histológicos de NSCLC (SODER et al., 1998; YOKOI et al., 2003). Novamente é necessário salientar que para as análises de expressão foram empregadas técnicas diferentes, sendo que na construção das bibliotecas para as análises de RNA-Seq ocasionalmente podem ocorrer erros, por exemplo, de incorporação de adaptadores, e amplificação, que podem interferir na qualidade dos dados de algumas regiões do genoma. Outro fato a ser levado em consideração é a possível variabilidade genética dos tumores. Por exemplo, já foi descrito anteriormente que alguns tumores NSCLC podem apresentar amplificações na região cromossômica 3q26, na qual *TERC* é considerado um alvo potencial (YOKOI et al., 2003). Essa amplificação pode estar associada a desregulação de expressão de *TERC* nos tumores. Porém, investigações futuras são necessárias para classificar *TERC* como biomarcador para o subtipo LUSC. Fato este de grande importância, pois há carência de biomarcadores relacionados a câncer de pulmão, principalmente para o subtipo histológico LUSC (VILLALOBOS; WISTUBA, 2017). Portanto, o presente estudo forneceu mais uma evidência sobre a alteração da expressão de *TERC* no subtipo LUSC.

Em suma, observou-se que nos tumores do subtipo LUSC avaliados, possivelmente, há ação de mecanismos clássicos de manutenção telomérica, caracterizado pela ativação do complexo telomerase, pois foi encontrada expressão aumentada de genes como *TERT*, *DKC1*, *RUVBL1* e *RUVBL2*. Identificou-se, também, alta expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas em mecanismos de reparo não homólogos RBBP8 e PARP1, e de reparo homólogos RAD51 e BRCA2 (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016), sugerindo ação massiva de mecanismos de reparo a danos nos telômeros. Ademais, verificou-se expressão elevada dos genes *DNMT3B*, *DNMT3A* e *DNMT1*, os quais codificam proteínas fundamentais para os mecanismos de metilação de DNA nas regiões subteloméricas, manutenção do tamanho telomérico e processos de regulação epigenética dos telômeros (GONZALO et al., 2006). E por fim, foi identificado aumento da expressão das histonas *SUV39H1* e *SUV420H2* nos tumores de LUSC, estudados. Essas histonas exercem função na regulação epigenética dos telômeros (GARCÍA-CAO et al., 2003) e como relatado por Liu et al. (2015), *SUV39H1* pode atuar controlando processos de proliferação celular e apoptose em células de NSCLC. Portanto, a expressão elevada de *SUV39H1* verificadas nos grupos amostrais do subtipo LUSC, investigados no presente estudo, fornecem mais uma e

evidência da importância dessa proteína para o processo de oncogênese em NSCLC, sobretudo no subtipo LUSC.

### 5.5.2 Análise de expressão de genes associados a maquinaria telomérica utilizando dados do TCGA- LUAD

Nesta análise, 26 genes foram identificados com expressão desregulada, considerando o nível de significância de  $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$  (Tabela 14). Destacando-se seis genes que apresentaram expressão aumentada nas células tumorais em relação as normais, FC com valor  $\geq 1$ , *TERT*, *RAD51*, *DNMT3B*, *DKC1*, *BRCA2*, *DKC1* e *PARP1*. A tabela 14 está organizada de acordo com os valores de FC apresentados em ordem decrescente.

**Tabela 14 - Genes associados aos telômeros com expressão desregulada em pacientes com subtipo tumoral LUAD, cujos dados foram extraídos do TCGA**

Gene (símbolo)	Ensembl ID	Gene (nome)	log2FC	Valor de p	FDR
<i>TERT</i>	ENSG00000164362.17	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	5,313	0,000	0,000
<i>RAD51</i>	ENSG00000051180.15	<i>RAD51 recombinase</i>	2,147	0,000	0,000
<i>DNMT3B</i>	ENSG00000088305.17	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	2,020	0,000	0,000
<i>BRCA2</i>	ENSG00000139618.13	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	1,199	0,000	0,000
<i>DKC1</i>	ENSG00000130826.14	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	1,112	0,000	0,000
<i>PARP1</i>	ENSG00000143799.11	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>	1,078	0,000	0,000
<i>RUVBL1 (Pontin)</i>	ENSG00000175792.10	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	0,845	0,000	0,000
<i>DNMT3A</i>	ENSG00000119772.15	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	0,806	0,000	0,000
<i>RPA3</i>	ENSG00000106399.10	<i>Replication protein A3</i>	0,774	0,000	0,000
<i>ATR</i>	ENSG00000175054.13	<i>ATR serine/threonine kinase</i>	0,741	0,000	0,000
<i>DNMT1</i>	ENSG00000130816.13	<i>DNA methyltransferase 1</i>	0,735	0,000	0,000
<i>RTEL1</i>	ENSG00000258366.6	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	0,721	0,000	0,000
<i>XRCC4</i>	ENSG00000152422.14	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>	0,694	0,000	0,000
<i>RBBP8 (CTLP)</i>	ENSG00000101773.15	<i>RB binding protein 8, endonuclease</i>	0,658	0,000	0,000
<i>SUV39H1</i>	ENSG00000101945.15	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	0,603	0,000	0,000
<i>XRCC5 (ku 80)</i>	ENSG00000079246.14	<i>X-ray repair cross complementing 5</i>	0,527	0,000	0,000
<i>CBX5</i>	ENSG00000094916.12	<i>Chromobox 5</i>	0,518	0,000	0,000
<i>POT1</i>	ENSG00000128513.13	<i>Protection of telomeres 1</i>	0,491	0,000	0,000
<i>RPA2</i>	ENSG00000117748.8	<i>Replication protein A2</i>	0,426	0,001	0,003
<i>MRE11</i>	ENSG0000020922.11	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	0,420	0,000	0,000
<i>HSP90AA1</i>	ENSG00000080824.17	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	0,370	0,002	0,005
<i>PTGES3</i>	ENSG00000110958.14	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	0,329	0,002	0,005
<i>RAD50</i>	ENSG00000113522.12	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>	0,275	0,001	0,003
<i>TERF2 (TRF2)</i>	ENSG00000132604.9	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>	0,255	0,002	0,007
<i>SMG6 (Est1)</i>	ENSG00000070366.12	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	-0,365	0,001	0,002
<i>TINF2 (TIN2)</i>	ENSG00000092330.14	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	-0,496	0,000	0,000

Nota: FC, fold change; FDR, False Discovery Rate

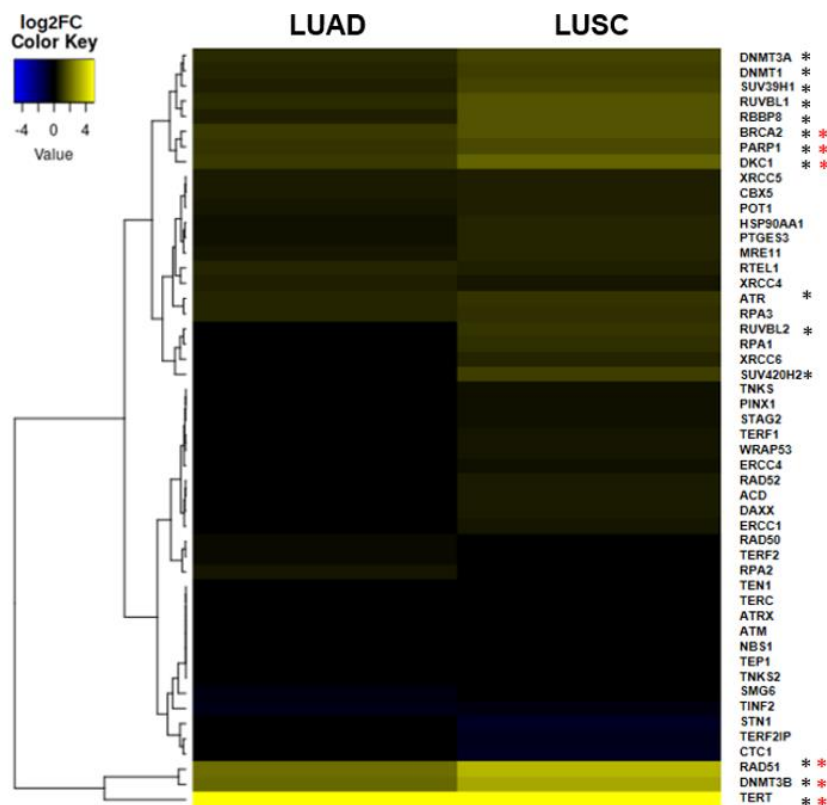
Os dados revelaram que na população estudada há predominância de tumores com expressão elevada de *TERT* (Log2 FC= 5,3) em relação aos seus respectivos controles (células de tecido normal adjacente), assim como foi identificado alta expressão de *DKC1*, proteína importante na formação do complexo TERT/ TERC (ALAWI; LIN, 2011). Foi identificada também a expressão elevada de *RAD51*, gene envolvido com

reparo por recombinação homóloga (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016), tal como *BRCA2*, com função de facilitar o acesso de RAD51 nos telômeros (BADIE et al., 2010). O gene que codifica PARP1, proteína importante para o reparo não homólogo nos telômeros (LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016), também foi identificado com expressão aumentada nessas células tumorais. Foi verificado também expressão elevada do gene que codifica a DNMT3B (FC= 2,1) responsável por metilar DNA em regiões subteloméricas (GONZALO et al., 2006).

Portanto, foi possível verificar que assim como no grupo amostral de tumores do subtipo LUAD de pacientes brasileiros (expressão gênica analisada por RNA-Seq, item 5.2) Os genes *RAD51*, *DNMT3B*, *BRCA2* e *DKC1* apresentaram alta expressão nas amostras do subtipo LUAD, cujos dados foram extraídos do TCGA. Outra semelhança encontrada foi a expressão aumentada do gene *TERT* (Log<sub>2</sub> = 5,3), tanto nas amostras do subtipo LUAD, cujos dados foram extraídos do TCGA quanto nas amostras de LUAD dos pacientes brasileiros, análises via RT-qPCR (item 5.2) e análises de transcrito utilizando dados de RNA-Seq (item 5.4).

Com a finalidade de resumir as análises dos dados obtidos no TCGA e verificar possíveis diferenças entre os perfis de expressão de genes associados aos telômeros em amostras de pacientes diagnosticados com o subtipo LUAD e pacientes com LUSC, foi construído um gráfico do tipo *heatmap* (Figura 12), com os valores de log<sub>2</sub> *Fold change* para cada um dos 50 genes analisados (linhas). Os genes que apresentaram maior expressão nas amostras tumorais em relação as normais,  $FC \geq 1$ , mostram coloração amarelada, já os genes com menor expressão nas amostras tumorais,  $FC \leq -1$ , mostram coloração azulada. Destacando que foi considerado para genes diferencialmente expressos,  $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$ .

Figura 12 - Gráfico do tipo *Heatmap*. 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

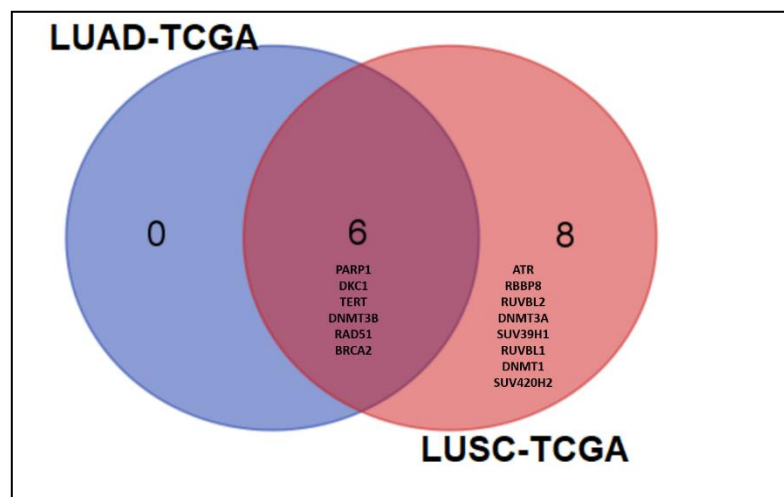


Nota: Os valores de expressão ( $\log_2$  Foldchange) de cada gene avaliado (linhas) foram plotados para cada grupo amostral analisado (coluna). Gráfico desenvolvido no software R (versão 3.4.1).

Não foram identificados genes que apresentaram expressão diminuída ( $FC \leq -1$ ,  $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$ ) nas amostras tumorais dos dois subtipos (LUSC e LUAD) analisados. Em geral foi observado que os genes associados aos telômeros estão mais expressos nas amostras de LUSC do que no subtipo LUAD, evidenciado por valores maiores de FC nas análises referente a LUSC (representados por tons mais amarelados no gráfico). Verificou-se que 14 genes estão com expressão aumentada em amostras do subtipo LUSC (genes indicados com asterisco preto) em comparação com seis genes que aparecem com expressão aumentada em amostras do subtipo LUAD (genes indicados com asterisco vermelho). Os genes *TERT*, *RAD51* e *DNMT3B* foram os mais expressos em ambos subtipos de tumores avaliados. Sendo que os genes, *RAD51* e *DNMT3B* apresentaram maiores valores de FC nas amostras do subtipo LUSC. Já *TERT* apresentou perfil de expressão semelhante nos subtipos LUSC ( $FC=5,2$ ) e LUAD ( $FC=5,3$ ), correspondendo a uma expressão 40 vezes maior de *TERT* nas células tumorais do que nas células normais, adjacentes ao tumor.

Com o intuito de se identificar sobreposições dos genes que apresentaram expressão aumentada ( $FC \geq 1$ ,  $p \leq 0,01$  e  $FDR \leq 0,01$ ) nos subtipos LUSC e LUAD foi construído um diagrama de Venn (Figura 13).

**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**



Nota: Diagrama desenvolvido pelo *software VENN DIAGRAMS*

O diagrama mostrou que os genes *PARP1*, *DKC1*, *TERT*, *DNMT3B*, *RAD51* e *BRCA2* apresentaram expressão aumentada tanto no subtipo LUAD, quanto no subtipo LUSC. Em contrapartida, os genes *ATR*, *RBBP8*, *RUVBL2*, *DNMT3A*, *SUV39H1*, *RUVBL1*, *DNMT1* e *SUV420H2* apresentaram expressão aumentada somente nas amostras tumorais do subtipo LUSC.

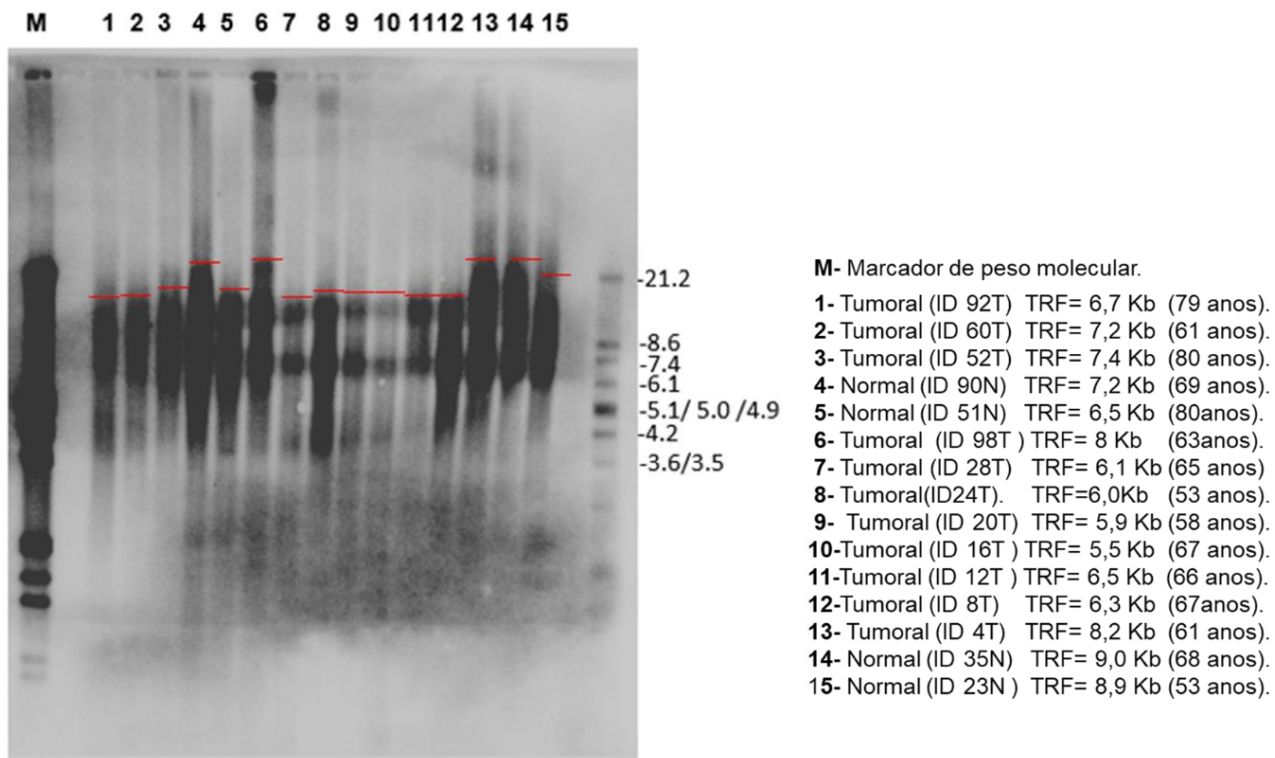
Assim como nos resultados obtidos das análises via RT-qPCR (item 5.2), há mais genes envolvidos com a maquinaria telomérica com expressão aumentada nas amostras do subtipo LUSC do que no subtipo LUAD, evidenciando que os telômeros e suas proteínas podem ter um papel importante no processo de oncogênese em LUSC e que dentre os genes associados aos telômeros podem haver marcadores moleculares específicos para o subtipo LUSC. Fato de grande importância, visto que na atualidade praticamente todos os alvos moleculares são específicos para LUAD.

## 5.6 Análise do perfil de restrição telomérico em amostras de pacientes diagnosticados com NSCLC

Com o objetivo de se estudar possíveis alterações no tamanho dos telômeros de pacientes com NSCLC, foi padronizada a técnica de *Southern Blot* telomérico. Esta técnica permite verificar alterações do tamanho de fragmentos de restrição teloméricos (*telomere restriction fragmente*, TRF) (KIMURA et al., 2010). No perfil de TRF, os telômeros são representados por uma “mancha” (*smear*) que corresponde a fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição que apresentam sítios posicionados nas regiões subteloiméricas dos diferentes cromossomos. Testes foram realizados para estimar o comprimento dos telômeros de amostras de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes com NSCLC (Anexo1). Para a padronização dos testes foram utilizadas diferentes quantidades de DNA genômico obtidos de tecidos, e os resultados mostraram que os ensaios podem ser realizados utilizando 3µg de DNA genômico para que se consiga obter o perfil do comprimento telomérico.

Na Figura 14 estão mostrados os tamanhos dos telômeros obtidos de amostras de tecido tumoral e normais adjacentes de diferentes pacientes com NSCLC, tratados no Hospital das Clínicas de Botucatu.

**Figura 14 - Perfil de TRF de tecidos tumorais e normais adjacentes ao tumor, de pacientes com NSCLC**



Nota: Southern blot telomérico obtido de fragmentos de DNA genômico (3 $\mu$ g) obtidos de amostras de tecido tumoral e histologicamente normal de pacientes com NSCLC, digerido com as enzimas de restrição *HinfI* e *RsaI*, hibridizados com a sonda Tel-DIG. A hibridização foi revelada por quimioluminescência utilizando-se anti-DIG e CPD Star. A linha vermelha indica a posição do maior fragmento telomérico presente em cada amostra.

A média do tamanho dos TRF para amostras tumorais (n= 11) foi de 6,7 kb e para as normais adjacentes (n=4) foi 7,9 kb. O Teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney* foi realizado com o intuito de checar se havia diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os valores de TRF dos dois grupos (tecido adjacente normal vs tecido tumoral). A mediana dos TRFs do grupo normal adjacente foi de 8,0 kb e a mediana do grupo tumoral de 6,5 kb, porém não se encontrou diferença significativa, valor de  $p= 0,090$ , entre os grupos avaliados, possivelmente pelo baixo número amostral.

É conhecido que tecidos tumorais, geralmente, possuem telômeros com menor TRF em comparação com tecidos normais adjacentes (BODELON; SAVAGE; GADALLA, 2014), fato já observado em câncer de próstata (HEAPHY et al., 2013), mama (MEEKER et al., 2004), colón (O'SULLIVAN et al., 2002) adenomas (RAMPAZZO et al., 2010), coloretal (O'SULLIVAN et al., 2006), glioblastoma (LA TORRE et al., 2011) e câncer de pulmão (HSU et al., 2007b; FERNÁNDEZ-MARCELO

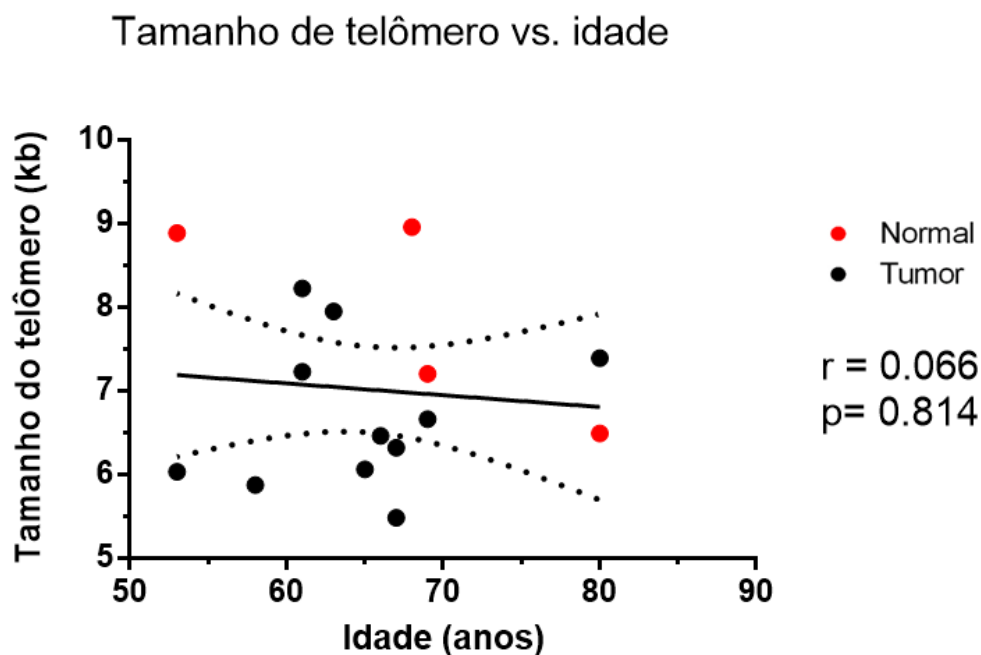
et al., 2015). Estudos com tumores de NSCLC vêm demonstrando que o tecido tumoral apresenta TRF menor do que os tecidos pulmonares normais. Em uma das pesquisas (HSU et al., 2007b) a média de TRF foi de  $5.32 \pm 1.53$  kb em tecidos normais e de  $3.95 \pm 1.92$  kb em tecidos tumorais. Em outro estudo as células tumorais de NSCLC apresentaram TRF de  $6.56 \pm 0.26$  Kb e as células normais  $7.00 \pm 0.19$  Kb (FERNÁNDEZ-MARCELO et al., 2015), corroborando os resultados obtidos na presente pesquisa.

O comprimento do telômero em tumores vem sendo estudado como possível novo biomarcador prognóstico (BISOFFI; HEAPHY; GRIFFITH, 2006), porém em câncer de pulmão os dados são contraditórios. Estudos mostram que tanto telômeros curtos quanto telômeros longos podem estar associados a um pior prognóstico (GANSNER; ROSAS, 2013). Dados de um dos estudos mais recentes mostraram que o pior prognóstico do paciente estava associado a um TRF abaixo de 7.29 Kb nas células tumorais (FERNÁNDEZ-MARCELO et al., 2015).

Foi realizada correlação de *Spearman* entre o tamanho de TRF das amostras (tecidos tumorais e normais) e a idade dos pacientes doadores, pois está bem fundamentado que os telômeros diminuem gradualmente de tamanho de acordo com a idade dos indivíduos (AVIV; LEVY; MANGEL, 2003). Telômeros humanos medem por volta de 5-15Kb (MOYZIS et al., 1988; ALLSHIRE; DEMPSTER; HASTIE, 1989; CROSS et al., 1989;), e a cada divisão celular diminuem a uma taxa de 50- 200pb (VAZIRI et al., 1993).

Na Figura 15, a medida de TRF de cada amostra analisada em comparação com a idade de cada paciente foi plotada em um gráfico de dispersão.

**Figura 15 - Correlação entre o TRF de células tumorais (NSCLC) e normais adjacentes e a idade dos pacientes**



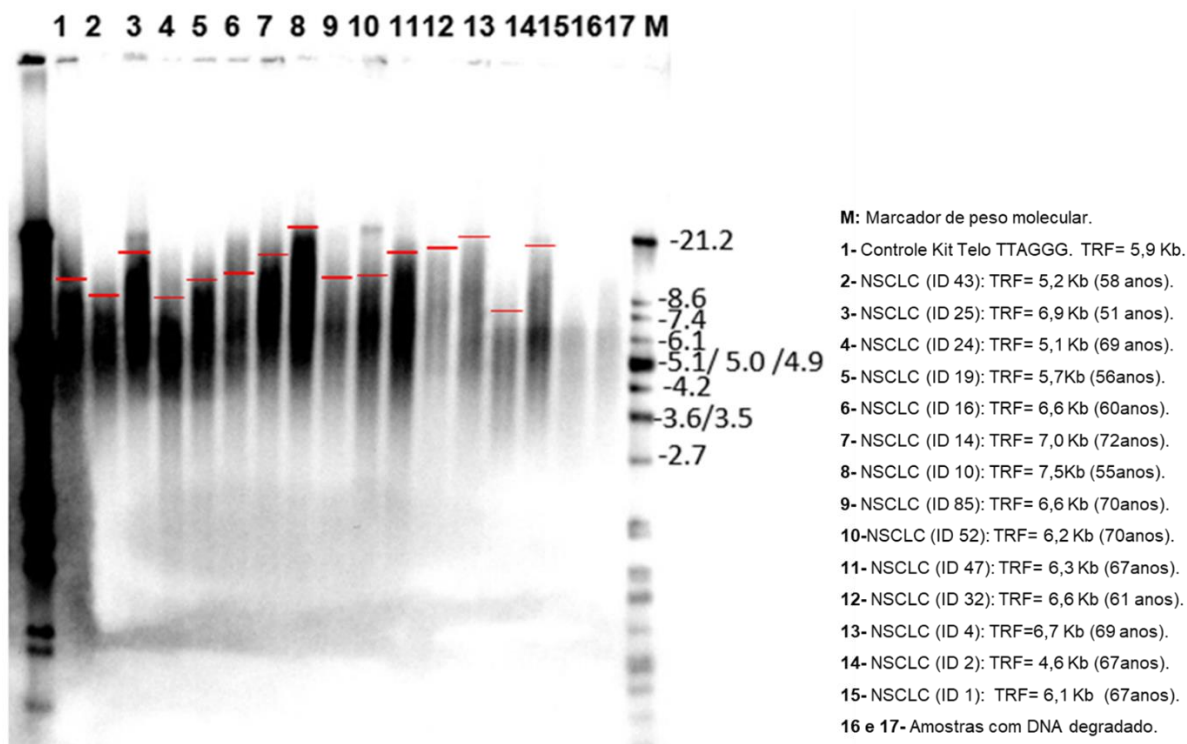
Nota: Gráfico de dispersão, evidenciando a correlação entre valores observados de TRF (eixo y) em amostras tumorais e histologicamente normais de pacientes com NSCLC e as idades dos respectivos pacientes (eixo x). ( $p < 0,05$ , Correlação de Spearman, *GraphPadPrism software* versão 6)

Pode-se observar que não houve correlação entre a idade do paciente e o tamanho dos telômeros das células tumorais e normais adjacentes ( $p = 0,066$  e  $r = 0,814$ ), possivelmente devido ao baixo número amostral estudado.

Também foram efetuados ensaios de *Southern blot* para se obter o TRF de células leucocitárias de pacientes com NSCLC (Anexo 3) e de indivíduos saudáveis (amostras controle - Anexo 4). Para a padronização dos testes, foram utilizadas diferentes quantidades de DNA genômico obtidos das amostras controle, e os resultados mostraram que os ensaios podem ser realizados utilizando  $1\mu\text{g}$  de DNA genômico obtido de leucócitos.

Na Figura 16, pode-se verificar o perfil de TRF de leucócitos de pacientes com NSCLC, tratados no Hospital das Clínicas de Botucatu.

**Figura 16 - Perfil de TRF da fração leucocitária de pacientes com NSCLC**



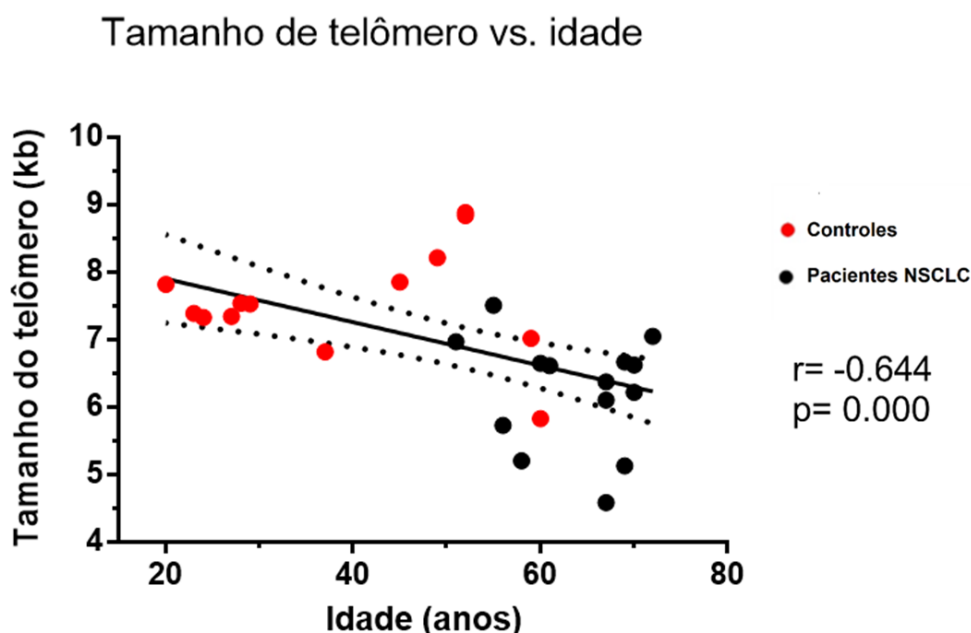
Nota: Southern blot telomérico obtido da hibridização de fragmentos de DNA genômico(1 $\mu$ g) digerido com as enzimas de restrição *HinfI* e *RsaI*, hibridizados com a sonda Tel-DIG. A hibridização foi revelada por quimiluminescência utilizando-se anti-DIG e CPD Star. A linha vermelha indica a posição do maior fragmento telomérico presente em cada amostra.

A média do TRF dos pacientes foi de 6,2 Kb e a média do TRF dos indivíduos controle foi de 7,6 Kb. O Teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, revelou que há diferença significativa ( $p= 0,00$ ) entre os valores de TRF dos grupos avaliados, sendo que os pacientes apresentaram TRF menor que os controles. Nessa análise foram avaliadas 13 amostras controles (amostras de doadores saudáveis) e 14 amostras de pacientes com NSCLC.

Muitos estudos investigam o tamanho dos telômeros em leucócitos como possíveis biomarcadores específicos ou como biomarcadores substitutos para TL (tamanho telomérico) em tecidos (BODELON; SAVAGE; GADALLA, 2014). Há evidências de correlação entre o TL de leucócitos e o TL medido em outros tecidos somáticos, uma vez que TL é hereditário (VAZIRI et al., 1993), porém pesquisas futuras são necessárias para avaliar a relação entre TL medido em leucócitos e TL medido em tecidos afetados por doenças. Em câncer de pulmão, há uma grande divergência de resultados obtidos de estudos que avaliam o TL em leucócitos, com alguns reportando que nos indivíduos doentes os telômeros estavam mais longos e outros reportando telômeros curtos (BODELON; SAVAGE; GADALLA, 2014). E os resultados obtidos na

presente pesquisa mostram que os telômeros dos pacientes são mais curtos em relação aos telômeros de indivíduos saudáveis. Porém, é necessário ressaltar que o tamanho amostral analisado foi baixo, devido à baixa disponibilidade de amostras. Além disso, há uma discrepância em relação à idade dos indivíduos saudáveis que consentiram doar amostras para serem utilizadas como controles nesta pesquisa, pois a maioria era mais jovem que os pacientes, fato que pode ter influenciado os resultados.

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



Nota: Gráfico de dispersão, evidenciando a correlação entre valores observados de TRF (eixo y) dos linfócitos de pacientes NSCLC e de indivíduos saudáveis (controles) e as idades dos respectivos doadores (eixo x). ( $p < 0,05$ , Correlação de Spearman, *GraphPadPrism software* versão 6).

Concluindo, como mostrado nas Figuras 14 e 15, o perfil de TRF das amostras de tecido tumoral não apresentaram alteração significativa quando comparados com as amostras de tecido normal e também não apresentaram correlação com a idade do paciente, porém é observado um baixo número amostral, principalmente de amostras normais adjacentes  $n = 4$ , fato que pode ter influenciado nos resultados obtidos. Já os leucócitos dos pacientes com NSCLC apresentaram telômeros menores em relação aos telômeros dos indivíduos saudáveis (Figuras 16 e 17).

## 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  $\leq -1$ ) 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  $\leq -1$ . 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  $\alpha$  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.

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

HANAHAHAN, 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 $\beta$  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, SL. 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<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 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- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 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.; MCDUGALL, 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.msmanuals.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 $\beta$  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.

## 8 ANEXOS

**Anexo 1. Características clínicas e histopatológicas dos casos incluídos nos estudos de expressão gênica e de perfil de restrição telomérico.**

Amostra ID (Normal/ Tumoral)	Histologia	Sexo	Idade (anos)	Tabagismo
4T	LUSC	M	61	SIM
5N/ 8T	LUSC	M	67	SIM
12T	LUSC	M	66	SIM
16T	LUSC	F	67	SIM
21T	LUAD	M	58	SIM
23N/ 25T	LUSC	M	53	SIM
27N/ 29T	LUSC	M	65	SIM
31N/ 32T	LUSC	M	52	SIM
37T	Misto (LUAD/LUSC)	M	68	SIM
39N/ 41T	LUAD	F	52	SIM
43N/ 44T	LUAD	M	72	SIM
46N/ 48T	LUAD	F	51	SIM
52T	LUAD	M	80	SIM
54N/ 56T	LUSC	M	73	SIM
60T	LUAD	F	61	SIM
62N/ 64T	LUAD	F	56	SIM
70N/ 72T	LUAD	M	71	SIM
84N/ 83T	LUAD	M	67	SIM
87N/ 88T	LUSC	M	67	SIM
90N/ 92T	LUSC	F	69	NÃO
98T	LUSC	M	63	SIM
110T	LUSC	M	54	SIM
114T	LUSC	M	65	SIM
123N/ 125T	LUAD	F	67	SIM
17T	LCC	M	56	SIM
95T	LUSC	F	62	SIM
126N/127T	LUSC	F	70	SIM
132T	LUSC	M	39	SIM

Nota: Amostras de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes portadores de NSCLC, provindos do Hospital das Clínicas de Botucatu, HCB. LUSC: carcinoma de células escamosas; LUAD: adenocarcinoma; LCC: carcinoma de células grandes, Misto (tumor com células LUAD e LUSC). F: feminino; M: Masculino. (\*) Sem informação.

**Anexo 2. Características clínicas e histopatológicas dos casos incluídos nos estudos de transcrito.**

<b>Amostra ID (Normal/Tumoral)</b>	<b>Histologia</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Tabagismo</b>
PU33N/PU33T	LUAD	M	72	SIM
PU52N/PU52T	LUAD	M	63	SIM
PU65N/PU65T	LUAD	F	83	SIM
PU72N/PU72T	LUAD	M	74	SIM
PU73N/PU73T	LUAD	F	66	NÃO
PU75/PU75T	LUAD	M	67	SIM
PU173N/PU173T-3	LUAD	M	64	SIM

Nota: Amostras de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes portadores de NSCLC, provindos do Hospital A.C. Camargo, SP. LUAD: adenocarcinoma. F: feminino; M: Masculino.

**Anexo 3. Características clínicas e histopatológicas dos casos incluídos nos estudos de perfil de restrição telomérico.**

<b>Amostra ID</b>	<b>Histologia</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idades (anos)</b>	<b>Tabagismo</b>
1	LUAD	M	67	SIM
2	LUSC	M	67	SIM
4	LUSC	F	69	NÃO
10	LUAD	F	55	SIM
14	LUAD	M	72	SIM
16	LUAD	F	60	SIM
19	LUSC	F	56	SIM
24	LUAD	M	69	SIM
25	LUAD	M	51	SIM
32	LUSC	F	61	SIM
43	LUSC	F	58	SIM
47	LUAD	F	67	SIM
52	LUSC	M	70	SIM
85	LUSC	F	70	SIM

Nota: Amostras sangue de pacientes portadores de NSCLC, provindos do Hospital das Clínicas de Botucatu, HCB. LUSC: carcinoma de células escamosas; LUAD: adenocarcinoma. F: feminino; M: Masculino.

**Anexo 4. Características dos casos controles incluídos nos estudos de perfil de restrição telomérico.**

<b>Amostra ID</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Tagismo</b>
C2	F	24	NÃO
C3	M	37	NÃO
C4	F	29	NÃO
C5	F	49	NÃO
C6	F	45	NÃO
C7	F	27	NÃO
C8	F	28	NÃO
C10	M	23	NÃO
C12	M	20	SIM
C13	M	60	NÃO
C17	F	59	NÃO
C19	M	52	NÃO
C21	F	52	NÃO

Nota: Amostras de sangue de indivíduos controles (saudáveis). F: feminino, M: masculino.

Anexo 5. Tabela com os genes e suas respectivas funções nos telômeros.

Gene (símbolo)	Gene ID	Gene (nome)	Função nos telômeros	Referências
<i>TERT</i>	7015	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	Subunidade catalítica da holoenzima telomerase essencial para replicação dos telômeros	(CHAN; BLACKBURN, 2004)
<i>DKC1</i>	1736	<i>Dyskerin pseudouridine synthase 1</i>	Componente do complexo telomerase e responsável por estabilizar a ligação de TERT/TERC	(ALAWI; LIN, 2011)
<i>WRAP53 (TCAB1)</i>	55135	<i>WD repeat containing antisense to TP53</i>	Componente do complexo telomerase, deslocamento para o corpo de cajal	(LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012)
<i>SMG6 (Est1)</i>	23293	<i>SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor</i>	Componente do complexo telomerase, importante no processo de replicação telomérica	(COLLINS, 2006)
<i>HSP90AA1</i>	3320	<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>	Chaperona que atua na regulação da atividade, estabilidade e localização do complexo telomerase	(COLLINS, 2006)
<i>PTGES3</i>	10728	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	Chaperona que atua na regulação da atividade, estabilidade e localização do complexo telomerase	(COLLINS, 2006)
<i>PINX1</i>	54984	<i>PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1</i>	Inibe a atividade da telomerase	(SOOHOO et al., 2011)
<i>TERC</i>	7012	<i>Telomerase RNA component</i>	RNA não codificador que contém sequência molde para a telomerase replicar os telômeros	(GILSON; GÉLI, 2007)
<i>TERF1 (TRF1)</i>	7013	<i>Telomeric repeat binding factor 1</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , proteção e regulação do tamanho dos telômeros	(DE LANGE, 2005)
<i>TERF2 (TRF2)</i>	7014	<i>Telomeric repeat binding factor 2</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , proteção e regulação do tamanho dos telômeros	(DE LANGE, 2005)
<i>ACD (TPP1)</i>	65057	<i>ACD, shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , recrutamento da telomerase e regulação do tamanho dos telômeros	(DE LANGE, 2005)
<i>POT1</i>	25913	<i>Protection of telomeres 1</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , proteção telomérica e recrutamento da enzima telomerase aos telômeros	(DE LANGE, 2005)
<i>TERF2IP (RAP1)</i>	54386	<i>TERF2 interacting protein</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , inibição da via de reparo NHEJ e regulação do tamanho telomérico	(DE LANGE, 2005)
<i>TINF2 (TIN2)</i>	26277	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>	Componente do complexo <i>Shelterin</i> , regulação do tamanho telomérico	(DE LANGE, 2005)
<i>TEN1</i>	100134934	<i>TEN1, CST complex subunit</i>	Componente do complexo CST, proteção e replicação telomérica	(CHEN; LINGNER, 2013)

<i>CTC1</i>	80169	<i>CST telomere replication complex component 1</i>	Componente do complexo CST, proteção e replicação telomérica	(CHEN; LINGNER, 2013)
<i>STN1</i>	79991	<i>STN1, CST complex subunit</i>	Componente do complexo CST, proteção e replicação telomérica	(CHEN; LINGNER, 2013)
<i>RAD52</i>	5893	<i>RAD52 homolog, DNA repair protein</i>	Recombinação homóloga e manutenção telomérica em leveduras (função não esclarecida em telômeros humanos)	(OGANESIAN; KARLSEDER, 2011)
<i>RAD51</i>	5888	<i>RAD51 recombinase</i>	Reparo a danos no DNA e recombinação homóloga	(BADIE et al., 2010)
<i>BRCA2</i>	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	Se associa aos telômeros na fase S e G2 para facilitar o acesso de RAD51	(BADIE et al., 2010)
<i>ATRX (RAD54)</i>	546	<i>ATRX, chromatin remodeler</i>	Recombinação homóloga e manutenção telomérica	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>DNMT3B</i>	1789	<i>DNA methyltransferase 3 beta</i>	Metilação de regiões subteloáticas, regulação do tamanho telomérico	(GONZALO et al., 2006)
<i>DNMT1</i>	1786	<i>DNA methyltransferase 1</i>	Metilação de regiões subteloáticas, regulação do tamanho telomérico	(GONZALO et al., 2006)
<i>DNMT3A</i>	1788	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>	Metilação de regiões subteloáticas, regulação do tamanho telomérico	(GONZALO et al., 2006)
<i>RTEL1</i>	51750	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>	Proteção e alongação telomérica	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>RPA1</i>	6117	<i>Replication protein A1</i>	Reparo e replicação telomérica	(GILSON; GÉLI, 2007)
<i>RPA2</i>	6118	<i>Replication protein A2</i>	Reparo e replicação telomérica	(GILSON; GÉLI, 2007)
<i>RPA3</i>	6119	<i>Replication protein A3</i>	Reparo e replicação telomérica	(GILSON; GÉLI, 2007)
<i>ATR</i>	545	<i>ATR serine/threonine kinase</i>	Quinase envolvidas com respostas a danos no DNA e regulação da telomerase	(TONG et al., 2015)
<i>ATM</i>	472	<i>ATM serine/threonine kinase</i>	Quinase envolvidas com respostas a danos no DNA e regulação da telomerase	(TONG et al., 2015)
<i>NBS1 (NBN)</i>	4683	<i>Nibrin</i>	Reparo a danos no DNA (reparo a quebras de fita dupla), forma o complexo MRN	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>RAD50</i>	10111	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>	Reparo a danos no DNA (reparo a quebras de fita dupla), forma o complexo MRN	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>MRE11</i>	4361	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>	Reparo a danos no DNA (reparo a quebras de fita dupla), forma o complexo MRN	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>XRCC6 (Ku70)</i>	2547	<i>X-ray repair cross complementing 6</i>	Reparo ao DNA telomérico dupla fita, constituinte da via c-NHEJ de reparo não homólogo	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)

<i>XRCC5</i> ( <i>ku80</i> )	7520	<i>X-ray repair cross complementing 5</i>	Reparo ao DNA telomérico dupla fita, constituinte da via c-NHEJ de reparo não homólogo	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>RUVBL1</i> ( <i>Pontin</i> )	8607	<i>RuvB like AAA ATPase 1</i>	Biogênese do complexo ribonucleoprotéico telomease	(VENTEICHER et al., 2008)
<i>RUVBL2</i> ( <i>Reptin</i> )	10856	<i>RuvB like AAA ATPase 2</i>	Biogênese do complexo ribonucleoprotéico telomease	(VENTEICHER et al., 2008)
<i>KMT5C</i> ( <i>SUV420H2</i> )	84787	<i>Lysine methyltransferase 5C</i>	Regulação epigenética dos telômeros	(BENETTI et al., 2007)
<i>SUV39H1</i>	6839	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>	Regulação epigenética dos telômeros	(GARCÍA-CAO et al., 2003)
<i>TEP1</i> ( <i>TP1</i> )	7011	<i>Telomerase associated protein 1</i>	Componente do complexo telomerase	(COLLINS, 2006)
<i>TNKS2</i>	80351	<i>Tankyrase 2</i>	Regula o tamanho telomérico através de interação com TRF1	(HSIAO; SMITH, 2008)
<i>TNKS</i>	8658	<i>Tankyrase</i>	Regula o tamanho telomérico através de interação com TRF1	(HSIAO; SMITH, 2008)
<i>ERCC1</i>	2067	<i>ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit</i>	Manutenção da integridade telomérica, impede a ação da via NHEJ	(ZHU et al., 2003)
<i>ERCC4</i>	2072	<i>ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit</i>	Manutenção da integridade telomérica, impede a ação da via NHEJ	(ZHU et al., 2003)
<i>CBX5</i>	23468	<i>Chromobox 5</i>	Regulação epigenética dos telômeros	(GARCÍA-CAO et al., 2003)
<i>PARP1</i>	142	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>	constituente da via alt-NHEJ de reparo não homólogo	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>RBBP8</i> ( <i>CTLP</i> )	5932	<i>RB binding protein 8, endonuclease</i>	constituente da via alt-NHEJ de reparo não homólogo	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>XRCC4</i>	7518	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>	Reparo ao DNA telomérico dupla fita, constituinte da via c-NHEJ de reparo não homólogo	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)
<i>STAG2</i>	10735	<i>Stromal antigen 2</i>	STAG2 ativo em células cancerosas indicam que os telômeros apresentam ao mesmo tempo, mecanismo ALT e reativação da telomerase	(DANILOSKI; SMITH, 2017)
<i>DAXX</i>	1616	<i>Death domain associated protein</i>	Recombinação homóloga e manutenção telomérica	(LAZZERINI-DENCHI; SFEIR, 2016)