

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

LUCAS KICH GRUN

**COMPROMETIMENTO DA HOMEOSTASE TELOMÉRICA E INDUÇÃO DO
FENÓTIPO SENESCENTE NO CONTEXTO DA OBESIDADE**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Grun, Lucas Kich
Declínio da homeostase telomérica e indução do
fenótipo senescente no contexto da obesidade / Lucas
Kich Grun. -- 2019.
163 f.
Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues
Guma.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Envelhecimento. 2. Obesidade. 3. Telômeros. 4.
Mitocôndrias. 5. Senescência. I. Guma, Fátima
Theresinha Costa Rodrigues, orient. II. Título.

LUCAS KICH GRUN

**COMPROMETIMENTO DA HOMEOSTASE TELOMÉRICA E INDUÇÃO DO
FENÓTIPO SENESCENTE NO CONTEXTO DA OBESIDADE**

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

Área de conhecimento do CNPq: Bioquímica/Biologia Molecular

Linha de Pesquisa: Biomarcadores de inflamação e senescência celular

Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma (a partir de 08/2019)

Orientadora: Florencia María Barbé-Tuana (09/2015 - 07/2019)

PORTO ALEGRE

2019

AGRADECIMENTOS

Todas as pessoas que estiveram comigo durante esses anos foram importantes de alguma forma, e merecem meus profundos e sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, nada disso seria possível se não fosse pelos alicerces da minha vida, que permitiram que eu pudesse seguir meus sonhos com apoio incondicional, independente do caminho que eu desejava percorrer. Meus pais, Jorge e Mari são a base de tudo e minhas duas maiores e mais importantes referências, e merecem meu amor, respeito e admiração para sempre. Se cheguei até aqui, é porque vocês me mostraram todos os caminhos e me proporcionaram todas as condições que eu precisava. Nós estamos aqui e conquistamos tudo isso juntos.

O ambiente do laboratório 21 é maravilhoso por ser um reflexo proporcionado pela maneira como a Prof. Dra. Fátima lidera e conduz o grupo de pesquisa. É um orgulho imenso fazer parte do grupo do laboratório 21 há 9 anos! Meus profundos agradecimentos à Prof. Fátima que me acolheu no seu laboratório quando eu ainda era um aluno à procura de estágio, e que me incentivou a seguir na pesquisa durante todos esses anos e fez parte da minha orientação e formação acadêmica.

Agradeço de uma maneira muito especial à Prof. Dra. Florencia, minha mentora e maior exemplo profissional. Meus mais sinceros agradecimentos por todas as portas que foram abertas por ti ao longo de todo o período. Foram anos maravilhosos de orientação e aprendizado, e eu sou muito grato por fazer parte desse grupo desde o início. Sempre serás considerada um espelho para mim. Obrigado por tudo, Flo, e tenha certeza de que meus passos serão baseados no caminho que tu tens trilhado profissionalmente.

Agradeço também à minha família que estiveram próximos e me apoiaram como puderam. Em especial, agradeço aos meus dindos, Rudi e Lisa, que sempre foram como segundos pais para mim, e estiveram sempre presentes. Minha vó Nelsi e meu tio Hardi também foram importantíssimos em toda essa jornada, e merecem todo o reconhecimento. Como filho único, sempre fui muito próximo de meus primos, e agradeço muito a eles por serem meus irmãos em vários momentos ao longo da vida. Em especial agradeço ao Cristian, Alexandre e à Kesi, a minha mais irmã do que prima, que sempre foi um exemplo na minha vida.

Minhas tias emprestadas também merecem um agradecimento especial. Obrigado Lúcia e Leda por fazerem parte desse momento especial.

Agradeço imensamente a todos os meus colegas e amigos do laboratório 21 durante esses 9 anos de convivência e parcerias. A composição do laboratório mudou ao longo desse tempo, mas cada um que conviveu comigo nesse período, eu agradeço muito. Em especial agradeço aos colegas que continuam no laboratório: Sílvia, Leo, Fran e Babi são os mais antigos e os que me ensinaram (e continuam ensinando diariamente) muita coisa dentro e fora do laboratório. Cleverson, Ari, Mari Ilha, Luis Pedro, Nicolly, Renata e Luiz Felipe obrigado por todos os dias de convivência e conversas (científicas ou não) nas rodas de mate do laboratório 21.

Tenho a sorte de poder dividir minhas horas de trabalho com pessoas incríveis que num estalar de dedos se tornaram pessoas fundamentais na minha vida por serem muito especiais. A conexão criada no Grupo de Inflamação e Senescência Celular é maravilhosa porque é composta de pessoas maravilhosas. Obrigado por tudo Mari Parisi, Cari e Laurinha! Um obrigado especial para o Rafa que me ajudou muito no final da tese, e esteve durante todos os dias me ajudando com ideias novas e na execução dos experimentos. Por fim, agradeço aos queridos Pati e Vini por serem

tão sensacionais. Pouco que eu pudesse escrever seria o bastante para agradecer por tudo o que representam meus agradecimentos. Nossa amizade é tão importante que acabamos dividindo os ambientes profissional e pessoal. Obrigado por tudo sempre.

Agradeço também ao Diogo, que assim como a Pati e o Vini, divide sua maravilhosa companhia conosco. Obrigado pela leveza de convivência e ótimas conversas, dividindo experiências além da porta do laboratório, que sempre ensinam alguma coisa.

Meus amigos fora do laboratório também merecem um agradecimento muito especial. Tenho a sorte de estar rodeado por pessoas incríveis que compartilham momentos importantes comigo. Independente de qual grupo de amigos, sempre tive a certeza de que são os melhores. Agradeço do fundo do meu coração aos amigos que a biologia me apresentou, e que a cada momento dividido me ensinam mais sobre a vida. Aos meus amigos babilônicos que continuam muito presentes na minha vida ao longo de quase 15 anos de amizade. Aos meus amigos do futebol de 2ª feira e ao Danone FC, um grupo que eu tenho o prazer e o orgulho de participar desde o início, há mais de 5 anos, e que se tornaram amigos importantes e que compartilham grandes momentos comigo. É um grande agradecimento aos amigos que conheci dentro do Departamento de Bioquímica ao longo desses anos e que também fazem parte considerável do meu círculo de pessoas importantes. Muito obrigado a todos vocês. Em especial, agradeço a Ju, uma pessoa maravilhosa que eu me aproximei muito no último ano, e foi muito importante tanto dentro quanto fora do laboratório.

Agradeço a todos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a querida Cléia a quem eu sempre procurava para resolver algum problema, que nunca durou mais de cinco minutos para serem resolvidos por ela. Agradeço aos meus

amigos Giordano e Douglas, não só por todos os problemas resolvidos na secretaria, mas principalmente pela amizade que cresceu (dentro e) fora do ambiente de trabalho e que se tornou muito importante.

Também agradeço fortemente ao Juciano e ao Diego, que me ajudaram muito na aquisição das imagens por microscopia, e sempre estiveram à disposição para me ajudar no que era necessário.

Agradeço muito aos colaboradores que participaram e ajudaram na execução desse projeto. Agradeço em especial aos grupos dos Prof. Dr. Fabio Klamt e Prof. Dr. José Cláudio que contribuíram muito para os trabalhos realizados nessa tese. Também agradeço à equipe do Centro de Obesidade Mórbida da PUCRS liderados pelos Dr. Alexandre Padoin e Dr. Cláudio Mottin. Também agradeço ao coordenador do Laboratório de Fisiologia Respiratória Prof. Dr. Marcus Jones.

Também agradeço a disponibilidade e interesse de todos os voluntários que participaram dos projetos realizados nessa tese, de modo que auxiliaram nos dados coletados durante a pesquisa realizada.

Obrigado ao relator Prof. Dr. Guilhian Leipnitz pela relatoria e pela avaliação do trabalho ainda no período do exame de qualificação dessa tese. Também agradeço aos demais membros da banca avaliadora composta pela Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano e os Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela e Prof. Dr. Daniel Gelain. Obrigado pelas considerações e por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora.

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

“Tornamos nosso mundo significativo pela coragem de nossas perguntas e pela profundidade de nossas respostas.” (Carl Sagan)

APRESENTAÇÃO

PARTE I

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

Introdução

Objetivos

PARTE II

Capítulo 1: *Telomeres: chromosome end protective-complexes and its association with chronic diseases* (manuscrito publicado)

Capítulo 2: *TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity* (manuscrito publicado)

Capítulo 3: Indução do fenótipo senescente mediado por disfunção mitocondrial em células tronco adipo-derivadas através da exposição crônica ao ambiente obesogênico

PARTE III

Discussão

Conclusão

Perspectivas

REFERÊNCIAS

Referências citadas na PARTE I, PARTE II (capítulo 3) e PARTE III

ANEXOS

Lista de materiais e reagentes

Lista de tabelas

Lista de ilustrações

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS

Manuscritos publicados como coautor durante o período do doutorado

Trabalhos apresentados em eventos durante o período do doutorado

Orientações de alunos durante o período do doutorado

SUMÁRIO

PARTE I	11
I.1 RESUMO	12
I.2 ABSTRACT	13
I.3 LISTA DE ABREVIACOES	14
I.4 INTRODUO	18
I.4.1 Envelhecimento	18
I.4.2 Telômeros como biomarcadores de envelhecimento precoce	20
I.4.3 Senescência celular	26
I.4.4 Senescência associada à disfuno mitocondrial	30
I.4.5 Dinâmica e funo mitocondrial no envelhecimento	32
I.4.6 Obesidade como modelo de doença crônica relacionado à senescência ..	39
I.5 JUSTIFICATIVA	43
I.6 OBJETIVOS	45
I.6.1 Objetivo Geral	45
I.6.2 Objetivos específicos	45
PARTE II	46
II.1 Capítulo 1: "Telomeres: chromosome end protective-complexes and its association with chronic diseases"	47
II.2 Capítulo 2: "TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity"	56

II.3 Capítulo 3: Indução do fenótipo senescente mediado por disfunção mitocondrial em células tronco adipo-derivadas através da exposição crônica ao ambiente obesogênico.	73
II.3.1 Justificativa	74
II.3.2 Metodologia	75
II.3.3 Resultados.....	88
II.3.4 Conclusões parciais.....	105
PARTE III	106
III.1 DISCUSSÃO	107
III.2 CONCLUSÕES.....	124
III.3 PERSPECTIVAS.....	125
REFERÊNCIAS.....	126
ANEXOS	146

PARTE I

I.1 RESUMO

O envelhecimento é um processo biológico caracterizado pela deterioração progressiva das funções fisiológicas do organismo. A perda de função e o acúmulo de dano tecidual estão relacionados a uma série de marcadores celulares, dentre eles, o encurtamento acelerado de telômeros, acúmulo de células senescentes e o comprometimento da função mitocondrial. O estabelecimento do fenótipo senescente pode ser caracterizado pelo aumento na transcrição do gene *CDKN1A* (P21) e pela atividade da enzima β -galactosidase (β -gal), além de um conjunto de citocinas que constituem um secretoma capaz de contribuir para um estado de inflamação crônica, observado em doenças relacionadas à aceleração do envelhecimento. A obesidade é uma condição fisiológica caracterizada pela alteração na composição e a estrutura do tecido adiposo e uma desregulação metabólica. É uma doença associada a um estado de inflamação crônica, compartilhando aspectos relacionados ao envelhecimento e ao aparecimento de características de senescência de forma antecipada. Dessa maneira, o objetivo principal desta tese foi avaliar parâmetros relacionados à homeostasia do complexo telomérico e o impacto do ambiente oxidativo, característico da obesidade, na indução do fenótipo senescente. Para isso, relacionamos a homeostase do complexo telomérico de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com a indução do fenótipo senescente relacionado à disfunção mitocondrial em células tronco adipo-derivadas (ADSC) expostas ao plasma de indivíduos portadores de obesidade após 10 dias de tratamento. Nossos resultados demonstraram que indivíduos portadores de obesidade possuem telômeros mais curtos e uma desregulação na expressão dos componentes do complexo *shelterin* em PBMC, independente da ocorrência de comorbidades associadas à doença. Além disso, observamos um aumento do dano oxidativo relacionado ao aumento da lipoperoxidação e o conteúdo de proteínas carboniladas no plasma de indivíduos portadores de obesidade. A Análise de Componentes Principais (PCA) ainda sugere que o comprometimento da homeostase telomérica pode ser parcialmente explicado pela desregulação de TRF1, o qual não pôde ser revertido pelo aumento na resposta antioxidante não enzimática, decorrente de uma possível resposta celular adaptativa. Os efeitos crônicos do plasma de indivíduos portadores de obesidade sugeriram o gatilho da indução do fenótipo senescente em ADSC pelo aumento da atividade da enzima β -gal e um aumento na expressão de *CDKN1A*. Observamos um acúmulo de mitocôndrias danificadas e indícios de inibição da autofagia celular, características que podem contribuir na indução do fenótipo senescente no contexto da obesidade. Complementando os achados obtidos no sistema periférico (PBMC), nossos resultados ainda demonstram um aumento na expressão de TRF1 nas ADSC no início do fenótipo senescente, sugerindo novamente que TRF1 tem um papel importante na progressão do envelhecimento, tanto a nível de tecido adiposo quanto a nível sistêmico. Os dados obtidos nessa tese sugerem que a obesidade é uma doença que está associada à aceleração do fenótipo senescente em diferentes contextos celulares, induzindo a ativação de respostas moleculares antecipadas, similares aos mecanismos observados no envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento, obesidade, telômeros, *shelterin*, TRF1, hADSC, mitocôndria, senescência.

I.2 ABSTRACT

Aging is a biological process characterized by the progressive deterioration of the physiological functions of the organism. Loss of function and accumulation of tissue damage are related to several cell hallmarks, such as accelerated telomere shortening, senescent cell accumulation, and mitochondrial dysfunction. The establishment of the senescent phenotype can be characterized by the increase in CDKN1A (P21) gene transcription and the enzyme β -galactosidase (β -gal) activity, as well as a set of cytokines that constitute a secretome that contributes to a chronic inflammation state, observed in age-related diseases. Obesity is a multifactorial condition characterized by changes in the composition and structure of adipose tissue and excessive metabolic dysregulation. It is associated with a chronic low-grade inflammatory condition that accompanies metabolic dysfunction, sharing aspects related to anticipation of aging characteristics. Thus, the aim of this thesis was to evaluate parameters related to homeostasis of the telomeric complex and the impact of the obesity-related oxidative environment on the induction of senescent phenotype. To this end, we evaluated the telomere homeostasis of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and the senescence induction on adipose-derived stem cells (ADSC) by chronic exposure to an obesogenic environment. We demonstrated that obese individuals have shorter telomeres and dysregulated gene expression of shelterin components in PBMC, regardless of the occurrence of disease-associated comorbidities. In addition, we observed increased oxidative damage related to augmented lipoperoxidation and carbonyl protein content in plasma of obese individuals. Also, Principal Component Analysis (PCA) suggests that the impairment of telomeric homeostasis may be partially explained by the positive regulation of TRF1 and could not be reversed by the increase in non-enzymatic antioxidant response, observed as an adaptive cellular response. The chronic effects of obesogenic environment were observed after plasma incubation for 10 days. Our data suggested that the onset of senescent phenotype induction in ADSC was observed by increased β -gal enzyme activity and an increase in CDKN1A expression. After plasma incubation for 10 days. Furthermore, the accumulation of damaged mitochondria may be a response due to autophagy machinery impairment, so that it may contribute to the induction of senescent phenotype in the context of obesity. Our data further demonstrated an increase in TRF1 expression in ADSC at the onset of the senescent phenotype, suggesting that TRF1 plays an important role in the progression of aging, both at adipose and systemic levels. The data obtained in this thesis suggest that obesity is a disease that is associated with acceleration of the senescent phenotype in different cellular contexts, contributing to the activation of molecular responses that trigger characteristics observed in aging.

Keywords: Aging, obesity, telomeres, shelterin, TRF1, hADSC, mitochondria, senescence.

I.3 LISTA DE ABREVIÇÕES

AA	Anemia Aplástica
ADSC	Células tronco derivadas do tecido adiposo
AMPK	Cinase ativada por AMP
AO	Laranja de Acridina
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATR	ATM Relacionada a Rad-3
C₁₂FDG	5-Dodecanoilaminofluoresceína di-β-D-galactopiranosideo
CCL2 (MCP-1)	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
CCL27	Quimiocina motivo C-C ligante 27
CDK	Cinase dependente de ciclina
CDKN1A (P21)	Inibidor de CDK 1A
CDKN1B (P27)	Inibidor de CDK 1B
CDKN2A (P16)	Inibidor de CDK 2A
CDKN2B (P15)	Inibidor de CDK 2B
cDNA	DNA complementar
COM	Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica
DC	Disceratose Congênita
DDR	Resposta de Dano ao DNA
DKC1	Discerina
DMEM	Meio de cultura <i>Eagle</i> Modificado por Dulbecco
DRP1 (DLP1)	Proteína Relacionada à Dinamina 1
DSB	Quebras de DNA de Fita Dupla

dsDNA	DNA de fita dupla
E2F	Família E2 de Fatores de transcrição ligantes DNA
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIS1	Proteína de Fissão Mitocondrial 1
GNB2L1	Subunidade 2 da proteína de Ligação ao Nucleotídeo Guanina (proteína G)
hADSC	Células tronco Derivadas de Tecido Adiposo humanas
HHS	Síndrome Hoyeraal-Hreidarsson
HOXC10	Proteína <i>homeobox 10</i>
HPRT1	Fosforibosiltransferase Hipoxantina 1
HSC	Células Tronco Hematopoiéticas
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IPF	Fibrose Pulmonar Idiopática
LC3	Proteína de Cadeia Leve associada a microtúbulos 3
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MiDAS	Senescência Associada à Disfunção Mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
MTG	<i>MitoTracker™ Green FM</i>
MT-ND1	NADH Desidrogenase Mitocondrial
MTO	<i>MitoTracker™ Orange CMTMRos</i>

MTR	<i>MitoTracker™ Red CMXRos</i>
NAD⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido
NF-κB	Fator nuclear kappa B
O₂⁻	Superóxido
OCT4	Fator de transcrição 4 ligante de octâmero
OPA1	Atrofia Óptica 1
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução Salina Fosfato
PE	Conjunto (<i>pool</i>) de plasmas de indivíduos Eutróficos
PGC-1α	Co-ativador do receptor ativado por proliferação de peroxissomo 1α
PI	Iodeto de propídio
PO	Conjunto (<i>pool</i>) de plasmas de indivíduos portadores de Obesidade
POT1	Proteção aos Telômeros 1
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAP1	Proteína relacionada ao Ras
Rb	Proteína Retinoblastoma
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPLP0	Subunidade lateral P0 da proteína ribossômica
SA-β-gal	β-galactosidase Associada à Senescência
SAHF	<i>Foci</i> na Heterocromatina Associados a Senescência
SASP	Fenótipo Secretor Associado à Senescência

SFB	Soro Fetal Bovino
SOX4	Fator de transcrição SRY-box 15
SQSTM1 (P62)	Sequestossomo-1
ssDNA	DNA de fita simples
SVF	Fração Vascular Estromal
TASCC	Compartimento de Acoplamento espacial de Autofagia Associado ao TOR
TBX15	Fator de transcrição T-box 15
TCAB1	Proteína Corporal Telomerase Cajal 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERC	Componente de RNA da Telomerase
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TIN2	Fator Nuclear de Interação com TRF1 2
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
TP53	Proteína tumoral p53
TPP1	Tripeptidil Peptidase 1
TRF1	Fator de Ligação de Repetição Telomérica 1
TRF2	Fator de Ligação de Repetição Telomérica 2
β-gal	β -galactosidase

I.4 INTRODUÇÃO

I.4.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico caracterizado pela deterioração progressiva das funções fisiológicas do organismo. A perda de função e o acúmulo de dano tecidual estão relacionados ao aumento do desequilíbrio oxidativo, o que também aumenta o risco de desenvolver comorbidades e a susceptibilidade à morte (Paradies et al. 2010, Wang et al. 2013). Nesse sentido, a ciência tem um papel fundamental na investigação de evidências que buscam compreender as bases fisiológicas dos processos celulares que levam ao acúmulo de dano, bem como estudar mecanismos relacionados às respostas adaptativas que tentam restabelecer a homeostase do organismo (López-Otín et al. 2013).

De acordo com o estudo publicado por López-Otín, foram propostos nove marcadores associados com o envelhecimento, os quais podem ser classificados e agrupados quanto ao tipo do efeito no organismo. Os marcadores primários (encurtamento de telômeros, instabilidade genômica, perda da proteostase e alterações epigenéticas) causam danos celulares independentemente do acúmulo no ambiente. Já as consequências fisiológicas dos marcadores antagonistas (senescência celular, disfunção mitocondrial e desregulação da sinalização de nutrientes) podem ter efeitos opostos, dependendo dos níveis e do contexto celular, de modo que a resposta pode ser benéfica ou deletéria. O terceiro grupo compreende os marcadores integrativos (exaustão de células dos compartimentos tronco e alteração na comunicação intercelular), que afetam diretamente a homeostase devido

ao acúmulo dos marcadores primários e antagonistas, comprometendo a função tecidual. Embora exista, de certa maneira, uma relação hierárquica entre os marcadores, a manifestação fenotípica é um processo dinâmico que interconecta as três classes de forma simultânea, promovendo juntas a progressão do envelhecimento (López-Otín et al. 2013) (Figura 1).

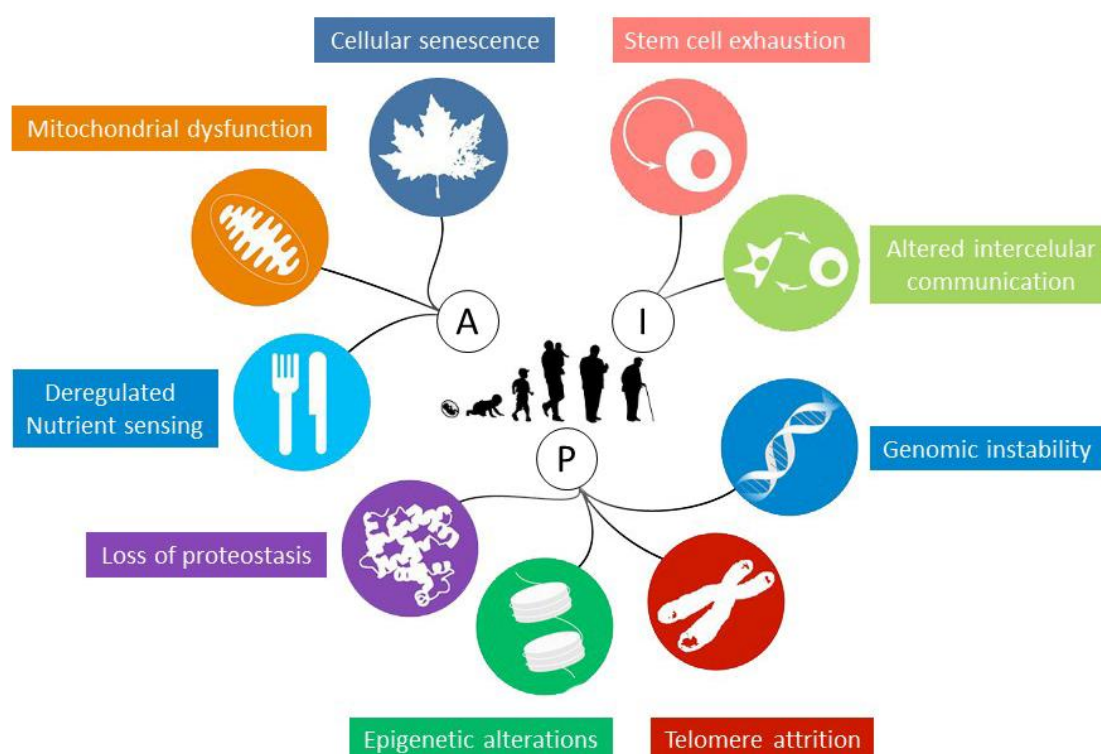


Figura 1. Marcadores do envelhecimento biológico. Esquema demonstrativo representando os nove marcadores celulares e moleculares, organizados em 3 grupos, que contribuem para a progressão do processo de envelhecimento. Abreviações: P: marcadores primários; A: marcadores antagonistas; I: marcadores integrativos (Adaptado de López-Otín et al. 2013).

Dessa forma, diversos estudos têm evidenciado que o envelhecimento não é um fenômeno celular biologicamente isolado, mas que está acoplado a uma alteração geral associada à um comprometimento na comunicação intercelular, capaz de modular o ambiente de células adjacentes (Freije e López-Otín 2012, Rando e Chang 2012). Entretanto, além de contribuir para o surgimento de desequilíbrios fisiológicos,

as síndromes metabólicas, como a obesidade, aceleram processos celulares relacionados ao envelhecimento, reduzindo o tempo de vida dos indivíduos (Dominguez e Barbagallo 2016, Frasca et al. 2017).

I.4.2 Telômeros como biomarcadores de envelhecimento precoce

O genoma de organismos eucariotos é composto por moléculas lineares de DNA que propagam a informação gênica por um processo de replicação semiconservativo. A fita contínua é estendida no sentido 5'-3' em direção à abertura da bolha de replicação, enquanto que a fita descontínua é sintetizada no sentido oposto, sintetizando a nova fita em pequenos fragmentos de DNA, chamados fragmentos de Okazaki (Okazaki et al. 1968). Entretanto, a enzima DNA polimerase requer um molde de DNA de fita dupla (dsDNA) e uma extremidade 3'OH livre, para realizar a síntese da nova fita. Nesse sentido, devido à incapacidade de a polimerase replicar completamente a fita descontínua, o mecanismo de replicação gera uma porção de fita simples na extremidade 3'OH do DNA. Esse fenômeno celular foi descrito por James Watson como "*problema final de replicação*", indicando que, ao longo de cada ciclo de divisão celular ocorre, naturalmente, uma perda progressiva de nucleotídeos na extremidade 3'OH dos cromossomos (Watson 1972). Fisiologicamente, o número de bases removidas a cada divisão não é constante, e depende de vários fatores como a taxa de divisão celular de cada tecido e organismo, além da posição e o tamanho da sequência de nucleotídeos do último iniciador de RNA que serve como molde para o início da síntese da nova fita de DNA e do tempo de extensão da nova sequência (Wellinger 2014).

Com o objetivo de compreender a capacidade de compensação do organismo em relação à perda de nucleotídeos resultantes do “*problema final de replicação*”, alguns trabalhos surgiram com a intenção de elucidar mecanismos moleculares relacionados à replicação do DNA (Harley 1991, Levy et al. 1992, Olovnikov 1996, Griffith et al. 1999, Ohki et al. 2001, Gilson e Géli 2007, de Lange 2009). A identificação (Greider e Blackburn 1985) e purificação (Greider e Blackburn 1987) da telomerase, uma enzima com atividade de transferase que atua na região terminal dos cromossomos, abriu um novo campo de estudo na área da biologia molecular.

Telômeros são estruturas nucleoproteicas especializadas localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares eucarióticos. São formados por uma região de dsDNA e uma saliência de fita simples na extremidade 3'OH, rica em guanina (Blackburn et al. 2015) (Figura 2A). São estruturas que desempenham um papel crítico na manutenção da integridade genômica e na preservação da informação genética, prevenindo a degradação nucleolítica (Shammas 2011), a recombinação espontânea (Lisby et al. 2010) e eventos de reparo que resultam na fusão cromossômica e no rearranjo de quebras das fitas de DNA, conferindo estabilidade cromossômica e homeostase genômica (Webb et al. 2013). O elevado grau de conservação entre as espécies sugere que a função desempenhada pelos telômeros provavelmente tenha surgido no início da evolução, de modo que as espécies que condensam o seu DNA em cromossomos lineares possam ter evoluído com um mecanismo ancestral de proteção à informação genética de forma muito similar (Szostak e Blackburn 1982, de Lange 2015, Lue 2018).

Em mamíferos, o DNA telomérico é protegido por um conjunto de proteínas que se associam ao DNA na porção de fita simples e dupla e, por conseguinte, protegem

a integridade do genoma. Esse complexo de seis proteínas, denominado complexo *shelterin*, forma uma estrutura intrincada e protege a extremidade livre do ssDNA, impedindo o reconhecimento da sequência como uma quebra de fita de DNA, e a consequente indução da resposta de dano ao DNA (DDR) (Sfeir 2012).

O complexo interage com o DNA da porção dos telômeros pela ligação das proteínas Fator de Ligação de Repetição Telomérica 1 (TRF1) e 2 (TRF2) na região do dsDNA, enquanto a proteína Proteção aos Telômeros 1 (POT1) se liga à região de fita simples. As proteínas TRF1, TRF2 e POT1 interagem através de uma ponte formada pelas proteínas TPP1 e TIN2, que não se ligam diretamente à fita de DNA. O sexto componente, Proteína Relacionada ao Ras (RAP1), proteína evolutivamente mais conservada entre as espécies, também não se liga diretamente ao DNA e interage exclusivamente com TRF2 (Erdel et al. 2017, Grun et al. 2019) (Figura 2B).

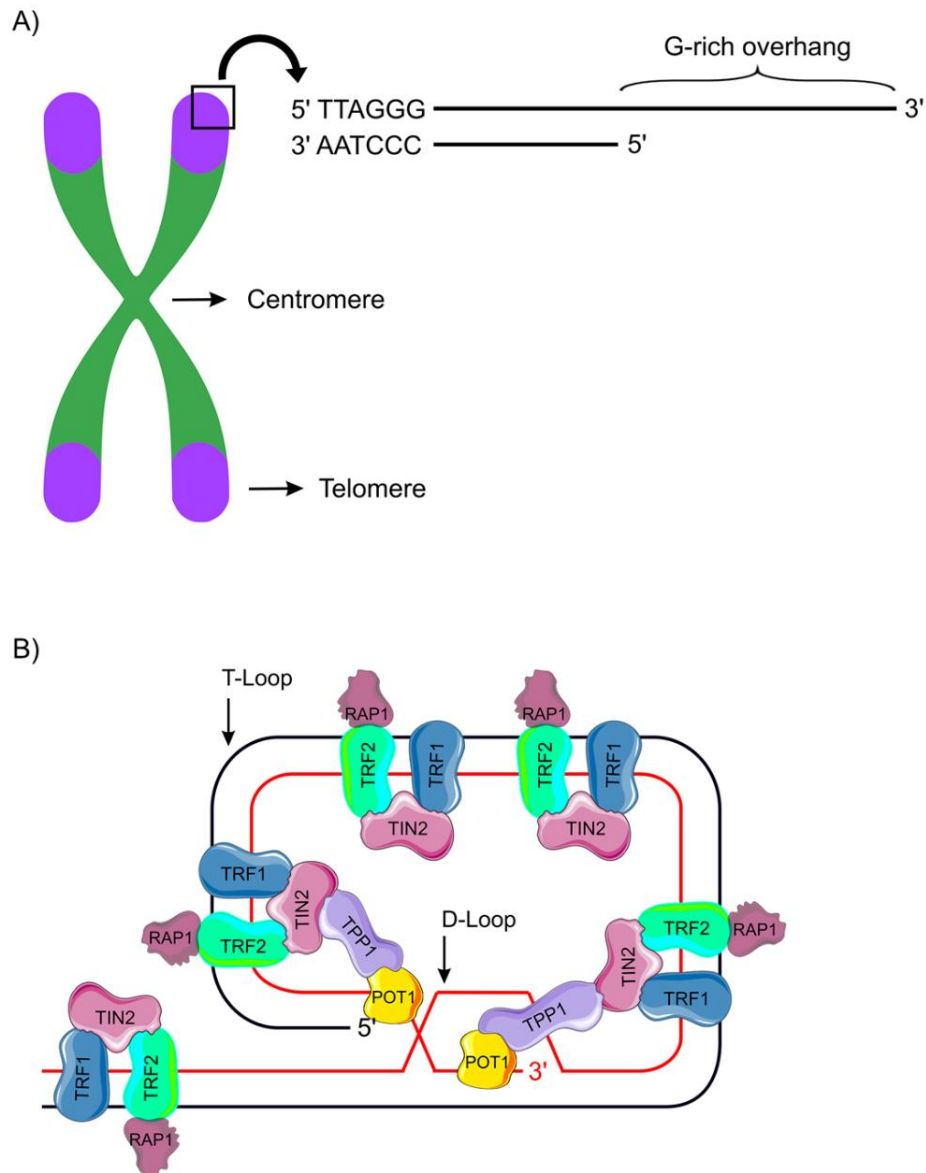


Figura 2. Localização e estrutura do complexo telomérico nos cromossomos eucarióticos. (A)

Os telômeros (porção violeta) estão localizados nas extremidades dos cromossomos e consistem em uma sequência de DNA de fita dupla e uma saliência de DNA de fita simples com a repetição da sequência TTAGGG na extremidade 3'OH. **(B)** O DNA telomérico é estabilizado por um complexo de seis proteínas denominado *shelterin*. O complexo forma uma estrutura a fim de manter a conformação 3D na extremidade final dos cromossomos. A extremidade 3'OH de fita simples é invaginada na porção de DNA de fita dupla para formar uma estrutura protetora, impedindo que a extremidade de fita simples seja reconhecida como uma quebra de fita DNA. Abreviações: TRF1: Fator de ligação de Repetição Telomérica; TRF2: Fator de ligação de Repetição Telomérica 2; RAP1: Proteína Relacionada ao Ras; TPP1: Tripeptidil Peptidase 1; TIN2: Fator Nuclear de Interação com TRF1 2; POT1: Proteção aos telômeros 1 (Adaptado de Grun et al., 2019).

Estudos demonstram que a proteína TRF1 auxilia na manutenção e regulação direta do comprimento dos telômeros pela interação com as proteínas TIN2, TPP1 e POT1 (Sfeir et al. 2009). Sua depleção está relacionada ao aumento da DDR, acelerando o fenótipo de envelhecimento (Marion et al. 2017). A proteína TRF2 tem a função de estabilizar a formação de um laço (*loop*) na sequência, protegendo a extremidade do ssDNA e reprimindo diretamente a sinalização da DDR. Além disso, a interação das proteínas RAP1 e POT1 é responsável por impedir eventos de recombinação homóloga (Xin et al. 2008).

A telomerase é a enzima responsável pela síntese *de novo* da porção final dos cromossomos ou DNA telomérico. Possui atividade de transcriptase reversa, sendo o principal mecanismo fisiológico pelo qual as células de mamíferos estendem os telômeros (Blackburn et al. 2015). Em humanos, a telomerase adiciona o hexâmero TTAGGG à extremidade 3'OH de DNA de fita simples (ssDNA) (Hukezalie e Wong 2013). O núcleo catalítico da telomerase é um complexo de riboproteínas composto por uma subunidade polipeptídica denominada Transcriptase Reversa da Telomerase (TERT) e um Componente de RNA da Telomerase (TERC) pertencente à família de RNAs não codificantes (Rubtsova et al. 2012).

A biogênese e a maturação do complexo que forma a holoenzima telomerase, composta pelas subunidades TERT e TERC, ocorre através de associações com proteínas e domínios específicos no corpo de Cajal (Blackburn 2001, Rubtsova et al. 2012), uma organela altamente conservada especializada na maturação das riboproteínas (Nandakumar e Cech 2013). Após a montagem da holoenzima funcional, as proteínas Tripeptidil Peptidase 1 (TPP1) e Fator Nuclear de Interação com TRF1 2 (TIN2) regulam o recrutamento de TERT para a extremidade 3'OH de fita simples de

DNA, em um processo facilitado pela Proteína Corporal Telomerase Cajal 1 (TCAB1) (Zaug et al. 2010, Egan e Collins 2012, Nandakumar et al. 2012, Frank et al. 2015) e Discerina (DKC1), que interage com domínios de RNA específicos, conferindo estabilidade à estrutura (Matera et al. 2007).

A atividade da enzima telomerase pode ser modulada e responde ao encurtamento de telômeros e aos eventos de degradação do DNA (Blackburn 2001). Dessa forma, o processo natural de encurtamento dos telômeros pode representar o ritmo do processo de envelhecimento (Shammas 2011). Essa definição sugere que o comprimento de telômeros poderia ser considerado um marcador de idade biológica alternativo, tanto a nível celular quanto sistêmico, indicando que o encurtamento acelerado de telômeros pode ser reconhecido como um biomarcador relacionado ao fenótipo de envelhecimento prematuro (Butt et al. 2010). Por conseguinte, o comprimento dos telômeros, a atividade da enzima telomerase e a integridade das proteínas que compõem o complexo *shelterin* são fatores fundamentais na fisiopatologia de várias doenças humanas.

De acordo com essa afirmação, diversos estudos indicam que doenças relacionadas ao envelhecimento precoce, como Disceratose Congênita (DC), Anemia Aplástica (AA), Fibrose Pulmonar Idiopática (IPF) e a Síndrome Hoyeraal-Hredarsson (HHS) são causalmente associadas com o encurtamento acelerado de telômeros. Mutações nas subunidades da enzima telomerase ou nos elementos que compõem o complexo *shelterin*, podem comprometer a viabilidade celular e a homeostase tecidual através da progressão das doenças (Mitchell et al. 1999, Armanios e Blackburn 2012, Kong et al. 2013, Holohan et al. 2014, Martínez e Blasco 2017).

Além disso, várias doenças e condições podem promover um ambiente crítico que pode acelerar a taxa de encurtamento da sequência telomérica. Nesse sentido, estudos sugerem que doenças crônicas, como doenças cardiovasculares (Sanders et al. 2011), diabetes mellitus (Salpea e Humphries 2010), síndromes metabólicas (Révész et al. 2014, Révész et al. 2015, Révész et al. 2017), doenças pulmonares (Kyoh et al. 2013, Albrecht et al. 2014, Belsky et al. 2014), entre outras, estão associadas com telômeros curtos independentemente da idade biológica (Kong et al. 2013). Ainda, doenças crônicas metabólicas compartilham características importantes e estão associadas ao estabelecimento de um ambiente pró-oxidante e pró-inflamatório que favorecem a disfunção telomérica (Pawelec et al. 2014).

Assim, ao atingir um comprimento crítico, a sequência do DNA telomérico pode induzir a sinalização para ativar a DDR, resultando na parada do ciclo celular e na transcrição de genes que ativam vias de senescência celular (Prescott et al. 2012).

I.4.3 Senescência celular

A senescência celular é um processo na qual as células induzem a parada do ciclo celular de forma permanente e acumulam alterações fenotípicas distintas, incluindo alterações estruturais na cromatina e na transcrição de genes que contribuem para a composição de um secretoma capaz de alterar metabolicamente mecanismos de resposta celular envolvidos na sobrevivência. O estabelecimento e progressão do fenótipo senescente ocorre geralmente em resposta a eventos de estresse celular, como danos genotóxicos, estresse oxidativo, estresse induzido (ou independente) da ativação de oncogenes e encurtamento de telômeros, de forma que

estejam relacionados com a antecipação de características observadas no envelhecimento (Adams 2009, Kuilman et al. 2010, Campisi 2013, Jung et al. 2019, Liu et al. 2019).

De fato, o termo “senescência celular” foi proposto por Hayflick e Moorhead, em um estudo realizado em fibroblastos humanos, observando a parada de sua capacidade proliferativa *in vitro*. Os autores observaram que as células acumulavam características fenotípicas relacionadas ao envelhecimento, além de apresentarem um número de divisões limitados, sugerindo que essas células não eram capazes de se multiplicar indefinidamente (Hayflick e Moorhead 1961). Posteriormente, esse tipo específico de senescência (denominado senescência replicativa), foi causalmente associada ao encurtamento fisiológico de telômeros (Blackburn e Gall 1978). Essa observação suporta a hipótese original de que a senescência é um mecanismo que impede o crescimento irrestrito de células danificadas, uma vez que o encurtamento crítico de telômeros pode promover o acúmulo de mutações levando à instabilidade cromossômica, as quais ativam a tumorigênese (Van Deursen 2014).

Além da parada do ciclo celular essencialmente permanente, o fenótipo senescente é caracterizado por outros marcadores moleculares e celulares, como alterações morfológicas, reprogramação metabólica, rearranjo da cromatina ou modulação da autofagia, de forma que a célula aumente seu tamanho em decorrência do conteúdo lisossomal e adquira uma morfologia achatada, além de aumentar a atividade da enzima β -galactosidase (β -gal) em pH próximo ao neutro (Lee et al. 2006, Morgunova et al. 2015). Além disso, a secreção de citocinas e quimiocinas que compõem o fenótipo secretor associado à senescência (SASP), como IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Evan e di Fagagna 2009, Coppé et al. 2010), e a diminuição nos níveis nucleares

de Lamin B1 (Shimi et al. 2011, Freund et al. 2012) estão geralmente associadas ao acúmulo de dano ao DNA nuclear, denominados *foci* na heterocromatina associados a senescência (SAHF), e também são características comuns de muitos tipos de senescência (Kuilman et al. 2010, Salama et al. 2014) (Figura 3).

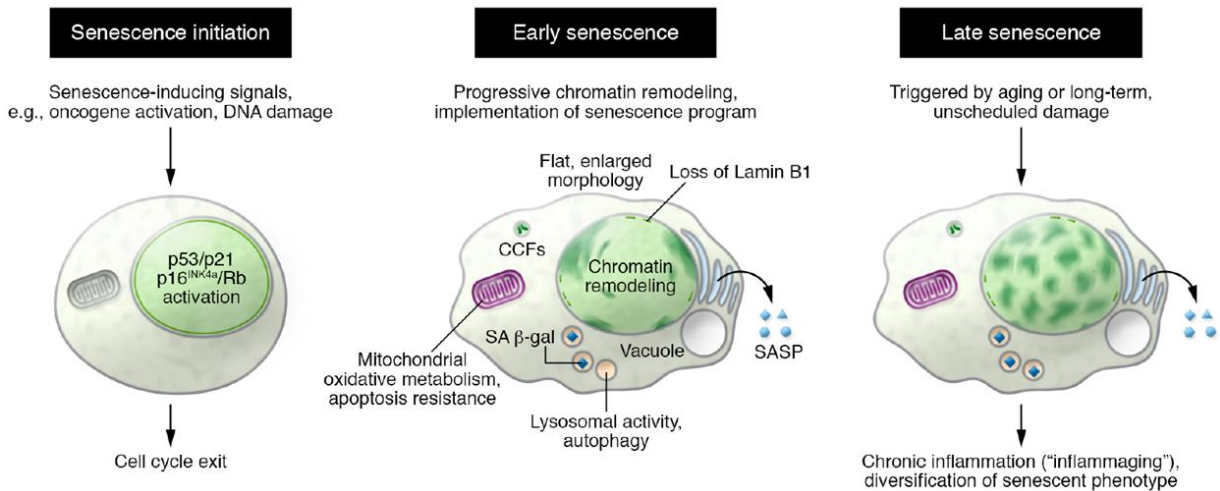


Figura 3. Características fenotípicas de células senescentes. A senescência é uma resposta celular ao estresse caracterizada pela parada estável do ciclo celular pela ativação das vias p53/21 e/ou p16. O estabelecimento do fenótipo senescente é caracterizado por um conjunto de marcadores celulares e moleculares, como o aumento da atividade lisossomal relacionada à atividade da enzima β-galactosidase associada a senescência (SA-β-gal), perda dos filamentos de Lamin B1 e secreção de citocinas e quimiocinas que compõem o SASP, além de alterações estruturais na cromatina e aumento do tamanho celular. A progressão do fenótipo senescente pode contribuir para um estado de inflamação crônica caracterizando o *inflammaging*, denotando a natureza complexa e diversa à senescência. Abreviações: SASP: Fenótipo Secretor Associado à Senescência; SA-β-gal: enzima β-galactosidase associada a senescência (Adaptado de Herranz and Gil, 2018).

A parada do ciclo celular, geralmente observado em células senescentes, difere essencialmente de células em estado quiescente, caracterizado pela parada temporária do ciclo celular através da sinalização de um fenótipo não secretor dependente de P27 (CDKN1B) que pode ser reestabelecido em resposta ao desafio mitogênico. Em condições de estresse e quando expostas à fatores que induzem a parada transiente do ciclo celular, como privação de fatores de crescimento ou inibição do crescimento por contato, células quiescentes entram em estado não-proliferativo

(fase G0) temporário, e, embora não possam ser distinguidas pelo conteúdo de DNA, possuem uma reduzida taxa de transcrição de RNA e tradução de proteínas ribossômicas, além de diminuir sua atividade metabólica (Sharpless e Sherr 2015, Mitra et al. 2018, Gorgoulis et al. 2019).

A indução do fenótipo senescente também pode ser ativada por uma persistente DDR, causada pelo encurtamento crítico de telômeros em resposta ao ambiente oxidativo ou indutores extrínsecos de dano, como a exposição à radiação- γ e quimioterápicos (di Fagagna 2008, Passos et al. 2009, Nardella et al. 2011). A ativação da DDR é mediada pela ativação da via Ataxia telangiectasia mutada (ATM) e ATM relacionada a Rad-3 (ATR), ativando a proteína tumoral 53 (TP53) e induzindo a parada do ciclo celular. Oncogenes ativados também podem ser indutores de senescência, causando erros de replicação do DNA e formação de quebras de DNA de fita dupla (DSB), ativando a DDR (Di Micco et al. 2006, Aird et al. 2013).

No entanto, dependendo do tecido, as células que compõem o fenótipo senescente não exibem necessariamente todos os marcadores descritos na literatura. Assim, as células senescentes são geralmente identificadas por expressar um conjunto dessas características (Campisi 2013).

De uma maneira geral, o acúmulo de estímulos que causam estresses celulares pode ativar as vias de sinalização que induzem o fenótipo senescente. Parte desses estímulos sinalizam as vias que fosforilam e ativam TP53, ativando proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina (CDK) como P15 (CDKN2B), P16 (CDKN2A), P21 (CDKN1A), P27 (CDKN1B). A TP53 ativada induz a ativação de P21, resultando em uma parada transiente do ciclo celular pela inibição da cinase dependente de ciclina 2 (CDK2). A sinalização para ativação de P16 também inibe a

progressão do ciclo celular, pela inibição das cinases dependentes das ciclinas 4 e 6 (CDK4 e CDK6, respectivamente). Tanto a sinalização de P21 como de P16 impede a inativação da proteína Retinoblastoma (Rb) por hipofosforilação, resultando na repressão contínua de genes da família E2 de fatores de transcrição ligantes DNA (E2F), necessários para a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Waaiker et al. 2012, Munoz-Espin e Serrano 2014, Van Deursen 2014).

I.4.4 Senescência associada à disfunção mitocondrial

As espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais são geradas como subprodutos da oxidação biológica durante a transferência de elétrons da cadeia respiratória na respiração mitocondrial. São moléculas altamente reativas que possuem capacidade de oxidação devido a um ou mais elétrons desemparelhados, e possuem um papel complexo na manutenção da homeostase do organismo (Bae et al. 2011).

O balanço oxidativo é um mecanismo que também pode desempenhar funções celulares vitais no sistema biológico em diferentes condições fisiopatológicas (Knopp e Paramsothy 2006). Sendo assim, flutuações normais de ROS, durante a produção de energia, atuam na regulação de vias metabólicas relacionadas a diversos processos celulares, como autofagia (Jiang et al. 2015), biogênese mitocondrial (Mordas e Tokatlidis 2015), resposta imune e senescência celular (Olsen et al. 2015), sinalização hormonal (Flohé 2016), homeostase peroxissomal (Sandalio e Romero-Puertas 2015), entre outros.

O aumento dos níveis de ROS e o acúmulo do dano oxidativo têm sido associados à progressão de várias patologias, incluindo doenças neurodegenerativas (Federico et al. 2012, Kim et al. 2015, Liu et al. 2017), obesidade (Fernández-Sánchez et al. 2011, Horn et al. 2017, Grun et al. 2018), câncer (Landry e Cotter 2014, Cordani et al. 2019) e envelhecimento prematuro (Kondratov et al. 2006, Weyemi et al. 2012, Davalli et al. 2016). Por esse motivo, a capacidade de sinalização via ROS é regulada em vários níveis por um sistema antioxidante complexo, com a finalidade de manter o estado redox em níveis fisiológicos, contribuindo para a homeostase tecidual (Sena e Chandel 2012).

A teoria dos radicais livres associada ao envelhecimento (Harman 1992) postula que o envelhecimento é o resultado de efeitos nocivos provocados pelo acúmulo de dano, e a capacidade do organismo lidar com os danos celulares induzidos por ROS. Dessa maneira, o desequilíbrio oxidativo desempenha um papel importante na determinação do tempo de vida do organismo. De acordo com esta teoria, o aumento da produção de ROS e o acúmulo de danos macromoleculares (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) são fatores importantes na contribuição para antecipação de características fenotípicas do envelhecimento, senescência, ou morte celular (Capel et al. 2005, Cui et al. 2012).

Assim, a homeostase mitocondrial parece estar intimamente relacionada com o processo de envelhecimento, uma vez que é considerada a principal fonte celular de produção de ROS durante a fosforilação oxidativa, bem como a principal organela alvo de sinalização, levando ao surgimento de fenótipos característicos do envelhecimento precoce (Bonomini et al. 2015).

Além disso, o declínio da eficiência no transporte de elétrons devido à disfunção dos complexos respiratórios, associado à diminuição dos sistemas antioxidantes incapazes de neutralizar o excesso de ROS e os danos oxidativos, causados pelo aumento de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), são importantes fatores relacionados à progressão do envelhecimento (Genova e Lenaz 2015, Kwon et al. 2015, Hoppel et al. 2017). Ainda, estudos sugerem que o acúmulo dessas mutações contribui, por sua vez, para deterioração da função mitocondrial, aumentando ainda mais a produção de ROS, retroalimentando um ciclo vicioso (Zorov et al. 2014).

I.4.5 Dinâmica e função mitocondrial no envelhecimento

A constante renovação de mitocôndrias é crucial a fim de manter organelas saudáveis durante o processo de envelhecimento. Em geral, a regulação da biogênese mitocondrial é influenciada por alterações nas condições energéticas e fisiológicas em resposta a algum estímulo. Nesse sentido, a disponibilidade de nutrientes, regulação hormonal, exercício físico, hipóxia e a progressão do fenótipo senescente podem afetar os mecanismos de gênese de mitocôndrias (Lee et al. 2002, Lee e Wei 2005, Mordas e Tokatlidis 2015). De acordo com essa hipótese, alguns estudos sugerem que além do aumento de mutações e deleções gênicas, a quantidade de mtDNA também diminui durante o envelhecimento, ou com doenças relacionadas com a idade em vários tecidos de mamíferos (Mengel-From et al. 2014, Wachsmuth et al. 2016, Ashar et al. 2017, Zhang et al. 2017).

O co-ativador do receptor ativado por proliferação de peroxissomo 1 α (PGC-1 α) é o principal mediador intracelular relacionado à mitogênese, responsável pela transcrição de fatores que ativam a expressão dos principais genes relacionados à estrutura e função mitocondrial (Scarpulla 2011). Além disso, a repressão de PGC-1 α está associado à progressão de diversas doenças crônicas, e sua deficiência foi relacionada com um modelo de fibrose pulmonar em roedores, reduzindo a função mitocondrial de fibroblastos (Caporarello et al. 2018). Nesse contexto, a cinase ativada por AMP (AMPK) parece ser crucial para regular o metabolismo de PGC-1 α na biogênese mitocondrial. A diminuição de AMPK foi relatada em animais envelhecidos e parece estar diretamente relacionada à resistência insulínica relacionada à idade, além de contribuir para o declínio da função mitocondrial (Reznick et al. 2007, Bujak et al. 2015).

As mitocôndrias são organelas extremamente dinâmicas e mantêm processos complexos através da biogênese e da maquinaria de fusão e fissão, um mecanismo de remodelamento de membranas mitocondriais controlados por enzimas GTPases da família das dinaminas. Esses processos permitem um constante remodelamento da arquitetura mitocondrial, permitindo transições morfológicas entre estruturas individuais e o estabelecimento de redes mitocondriais complexas (Scott e Youle 2010). Da mesma forma, o conteúdo mitocondrial total de uma célula é resultado de um equilíbrio dinâmico entre a biogênese e a degradação de mitocôndrias não funcionais pelo processo de autofagia mitocondrial, denominado mitofagia (Meyer et al. 2017).

As Mitofusinas 1 (MFN1) e 2 (MFN2) são responsáveis pela fusão da membrana externa da mitocôndria, enquanto a proteína Atrofia Óptica 1 (OPA1) é

responsável tanto pela fusão da membrana interna quanto pela manutenção da estrutura das cristas mitocondriais. O mecanismo de fissão é controlado pela expressão da Proteína de Fissão Mitocondrial 1 (FIS1), uma proteína acessória ancorada à membrana mitocondrial externa que auxilia no recrutamento da Proteína Relacionada à Dinamina 1 (DRP1/DLP1), que possui atividade de constrição de membrana, e é considerada a reguladora chave do processo de fissão mitocondrial em mamíferos (Lee e Yoon 2016) (Figura 4).

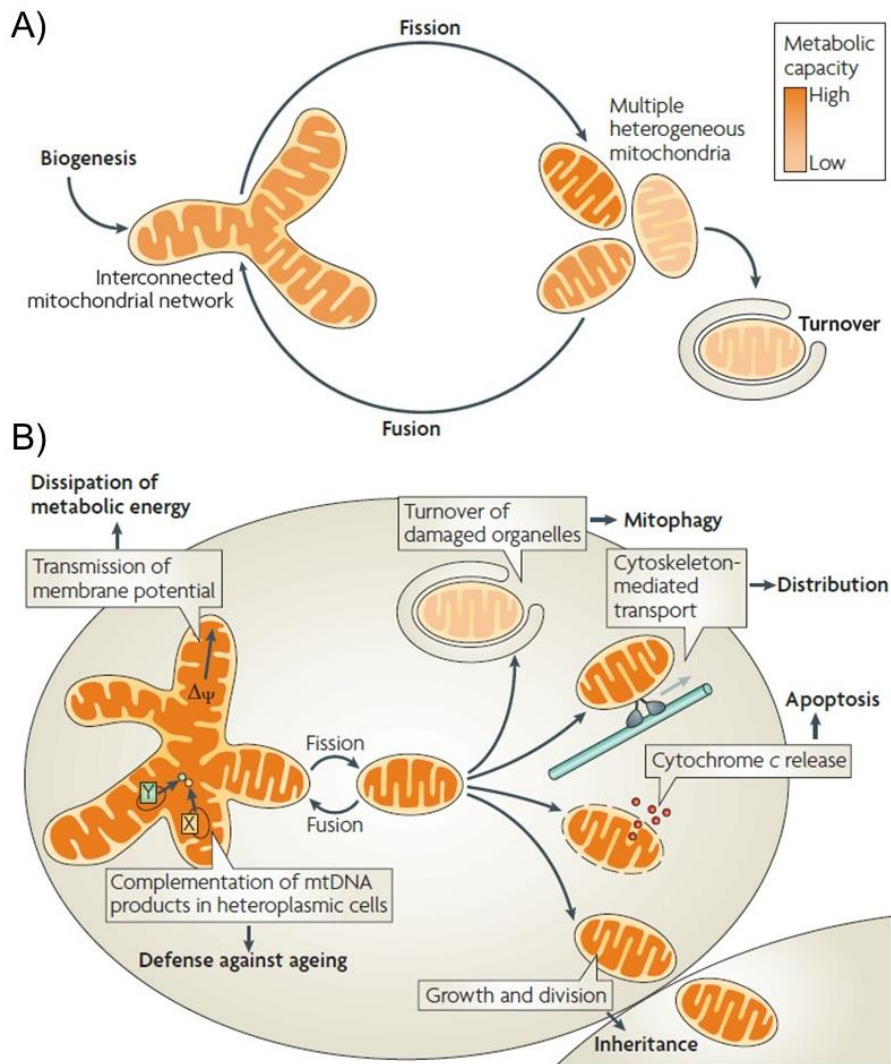


Figura 4. Ciclo de vida e dinâmica mitocondrial. **A)** A dinâmica do ciclo de vida mitocondrial é regulada pela mitogênese e um balanço entre eventos de fusão e fissão mitocondrial, que podem favorecer a formação de redes complexas de mitocôndrias interconectadas ou uma população heterogênea que pode culminar na reciclagem de mitocôndrias danificadas e despolarizadas. **B)** A fusão e a fissão de mitocôndrias são processos importantes para diferentes funções biológicas, dependendo do contexto celular, podendo estar associados a reciclagem de componentes mitocondriais durante a divisão celular, transporte de organelas mediado pelo citoesqueleto, liberação de fatores pró-apoptóticos no espaço intermembrana, além de estarem associados à dissipação do potencial de membrana e na troca de material genético a fim de combater o declínio fisiológico observado no envelhecimento tecidual (Adaptado de Westermann 2010).

Desequilíbrios na homeostase da dinâmica mitocondrial, controlado pelas proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão, bem como defeitos relacionados à biogênese de novas mitocôndrias, podem levar ao acúmulo de mitocôndrias não funcionais, comprometendo a produção de ATP e que por sua vez podem se tornar as principais mediadoras da ativação de vias metabólicas que ativam a morte celular pelo acúmulo de dano oxidativo (Suen et al. 2008, Gottlieb e Carreira 2010).

A autofagia é um mecanismo adaptativo de sobrevivência celular, com a finalidade de manter o *turnover* energético (Klionsky e Codogno 2013, Galluzzi et al. 2017, Dikic e Elazar 2018). É um processo celular catabólico de importância evolutiva, caracterizado pela autodegradação de componentes celulares danificados ou desnecessários e mediado pela formação de estruturas de membrana dupla denominadas autofagossomos. O mecanismo molecular de formação dos autofagossomos requer a fusão com lisossomos ou vacúolos, para a formação de autofagolisossomos, responsáveis por realizarem a reciclagem do material celular dependente da ação de hidrolases ácidas (Bento et al. 2016, Yin et al. 2016). O fenômeno autofágico mitocondrial é denominado mitofagia, e é um importante mecanismo na manutenção do número adequado de organelas funcionais em relação à demanda energética tecidual, além de auxiliar na reciclagem de mitocôndrias danificadas, as quais podem comprometer a função celular (Westermann 2010).

A proteína P62 (Sequestossomo-1 ou SQSTM1), é um receptor de autofagia essencial na formação de agregados proteicos à membrana do autofagossomo. Ela se liga com componentes da família das proteínas de cadeia leve associada a microtúbulos 3 (LC3) e a substratos ubiquitinados. A diminuição de seus níveis

proteicos pode ser um indicativo da ativação da via autofágica em situações de estresse celular (Jiang et al. 2015, Liu et al. 2016). Ainda, estudos demonstram que a inibição de autofagia leva ao acúmulo de P62, o qual pode induzir estresse celular e o desenvolvimento de patologias relacionadas ao acúmulo de componentes celulares danificados (Rusten e Stenmark 2010, Otten et al. 2018).

A literatura demonstra que há uma relação complexa entre o processo autofágico e a progressão do fenótipo senescente. Nesse sentido, estudos sugerem que a autofagia é ativada durante a senescência induzida por oncogenes, e o silenciamento dos principais reguladores do mecanismo autofágico pode atrasar a senescência mediada por SASP. Ainda, uma vez que a autofagia modula o SASP de uma maneira pós-transcricional, os autores também sugerem que a autofagia pode auxiliar na síntese de moléculas que compõem o secretoma do SASP (Young et al. 2009, Rubinsztein et al. 2011). Além disso, a literatura ainda sugere que a indução de dano ao DNA de forma aguda é capaz de induzir a ativação transiente da autofagia através da regulação negativa da via AKT-mTOR, de modo que, quando observado à nível populacional, se correlacionem inversamente com os marcadores de senescência. Nesse sentido, embora a cinética de ativação da autofagia pareça ser paralela (e não necessariamente dependente) dos mecanismos que ativam a senescência, a autofagia pode atuar como um mecanismo adaptativo, contribuindo na regulação do destino celular entre apoptose e senescência (Filippi-Chiela et al. 2015).

Dessa forma, a autofagia parece estar conectada paralelamente à progressão do fenótipo senescente e a doenças relacionadas ao envelhecimento precoce. De fato, tanto estudos em humanos como em modelos de roedores demonstram que há um acúmulo de autofagossomos em resposta à obesidade e à lipotoxicidade em

múltiplos compartimentos, incluindo os tecidos hepático e adiposo, de modo que a inibição da autofagia possa contribuir para a aceleração de patologias associadas à obesidade em múltiplos de tecidos (Öst et al. 2010, Kovsan et al. 2011, Nuñez et al. 2013).

Recentemente foi demonstrado que o comprometimento da função mitocondrial pode induzir um fenótipo senescente distinto, independente da via metabólica associada a interleucina 1 (IL-1) e fator nuclear kappa B (NF-κB), característica do fenótipo senescente mediado por SASP. Embora compartilhe características fenotípicas comuns à senescência mediada pelo secretoma que compõe o SASP, como a parada de ciclo e inibição da proliferação celular, aumento da atividade da enzima β-gal e perda de Lamin B1, o fenótipo MiDAS (senescência associada à disfunção mitocondrial) possui um secretoma distinto, mediado principalmente pela secreção de IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e quimiocina motivo C-C ligante 27 (CCL27). Ainda, os autores demonstraram que o fenótipo MiDAS não é causado pelo acúmulo de dano ao DNA e estresse oxidativo, mas sim pela diminuição dos níveis da razão entre nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidado e Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido (NAD⁺/NADH) e da ativação de TP53 mediada por AMPK. Dessa maneira, os autores sugerem que a ativação de TP53 limita a secreção de citocinas que compõem o SASP (Gallage e Gil 2016, Wiley et al. 2016). Corroborando com essa hipótese, estudos anteriores demonstraram que a ativação de AMPK pode induzir senescência pela fosforilação de TP53, promovendo a parada do ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico (Jones et al. 2005, Jiang et al. 2013).

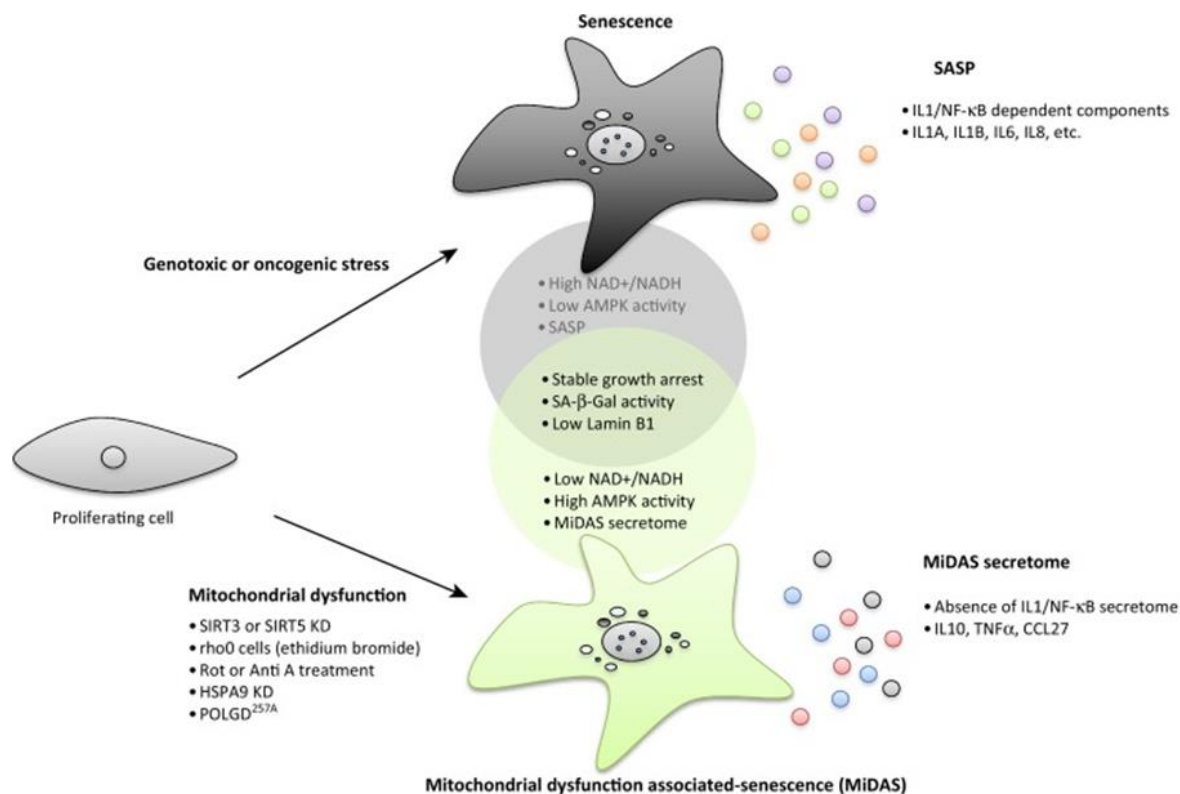


Figura 5. Senescência associada à disfunção mitocondrial (MiDAS). Características fenotípicas de senescência celular mediada por SASP e senescência induzida por disfunção mitocondrial (MiDAS) com seu secretoma próprio, composto por diferentes citocinas inflamatórias (Adaptado de Gallage and Gil 2016).

I.4.6 Obesidade como modelo de doença crônica relacionado à senescência

A obesidade é uma condição de saúde reconhecida como uma doença metabólica multifatorial crônica caracterizada pelo acúmulo do tecido adiposo principalmente decorrente de um excesso na ingestão calórica em detrimento de um baixo gasto energético (Bischof e Park 2015), promovendo a hiperplasia e a hipertrofia do tecido adiposo (Drolet et al. 2008, Longo et al. 2019).

Nos últimos anos, a Organização Mundial de Saúde relatou que 39% da população adulta mundial foi classificada com excesso de peso e 13% eram portadoras de obesidade (Organization 2017). Além disso, é um importante fator de

risco para o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas à idade e que também está associado a um estado inflamatório sistêmico induzido por elevados níveis de estresse oxidativo (Ellulu et al. 2016).

Por ser considerada uma condição multifatorial, a obesidade forma uma rede complexa entre elementos que podem contribuir para a progressão da doença, como fatores biológicos, psicossociais e comportamentais, que incluem composição genética, influências culturais e socioeconômicas (Skelton et al. 2011). Além disso, a obesidade está associada à ocorrência de diversas comorbidades que podem exercer um papel importante como fator de risco e contribuir para o envelhecimento precoce e à progressão do fenótipo. Dessa maneira, pacientes portadores de obesidade têm risco aumentado de desenvolver morbididades, como dislipidemias, diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), hipertensão, doenças cardiovasculares (CVD), além de contribuir para problemas respiratórios, apneia do sono, e alguns tipos de câncer (Apovian 2016).

O tecido adiposo é constituído por vários tipos celulares, incluindo adipócitos e uma fração vascular estromal (SVF), uma população heterogênea composta por fibroblastos, células do sistema imune (como linfócitos T, monócitos e macrófagos), células endoteliais, musculares e células tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC). Estas interagem de forma parácrina através de fatores como adipocinas, hormônios e citocinas inflamatórias (Symonds et al. 2003, Avram et al. 2005, Guilherme et al. 2008, Gnechi et al. 2016).

As ADSC compõem o tecido adiposo e possuem múltiplas funções, como a renovação celular e reparo espontâneo do tecido adiposo, a fim de manter a homeostase tecidual. Por sua característica multipotente, as ADSC são capazes de

se diferenciar em vários tipos de células *in vitro*, dependendo do estímulo indutor, como células mesodérmicas, incluindo os tecidos adipogênico, condrogênico, osteogênico e miogênico, através da expressão de genes específicos relacionados ao potencial de diferenciação ou fatores linhagem-específicos (Heydarkhan-Hagvall et al. 2008, Gimble et al. 2011, Mellor et al. 2015, Mangum et al. 2017). Dessa forma, a plasticidade celular e facilidade de obtenção e manipulação *in vitro* tornam as ADSC uma importante ferramenta para estudos que envolvam terapias de regeneração tecidual e imunomodulação que podem elucidar mecanismos envolvidos em diversos distúrbios, como em doenças pró-inflamatórias crônicas e engenharia tecidual (Bajek et al. 2016, Dykstra et al. 2017).

Ao longo da progressão da obesidade, o tecido altera sua composição, estrutura e função, em resposta ao acúmulo de fatores que induzem o aumento de estresse celular. Em decorrência dessa disfunção metabólica, além da hipertrofia de adipócitos, ocorre o aumento da infiltração de células do sistema imune promovendo um *milieu* pró-inflamatório, com aumento na secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias (como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), aterogênicas e diabetogênicas (Gregor e Hotamisligil 2011, Choi e Cohen 2017). Ainda, há o aumento no processo da fibrose tecidual devido ao acúmulo e deposição de matriz extracelular, a qual também contribui para a inflamação sistêmica e resistência à insulina. Além disso, a obesidade mórbida também pode contribuir para a exaustão dos compartimentos tronco de ADSC no tecido adiposo, diminuindo a capacidade de renovação em diversos tecidos (Bluher 2009, Reilly e Saltiel 2017, Louwen et al. 2018) (Figura 6).

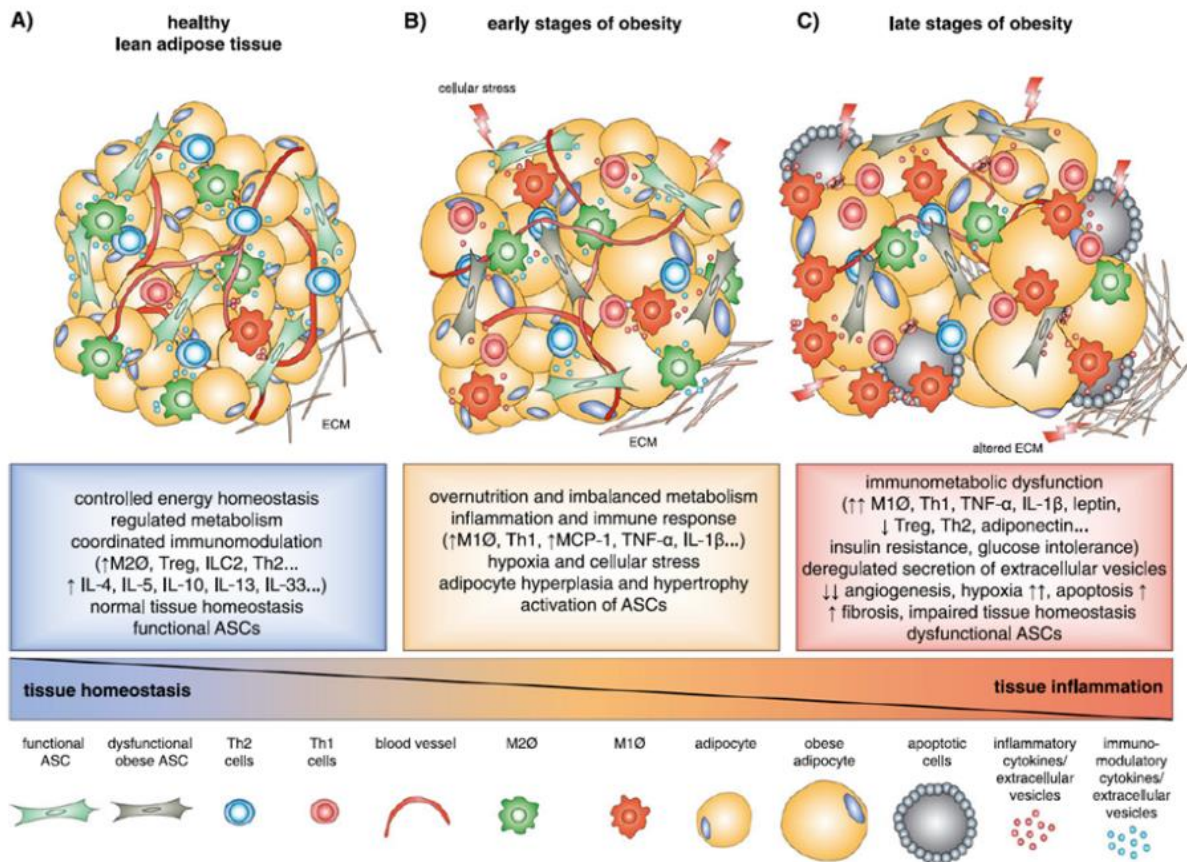


Figura 6. Composição do tecido adiposo na progressão da obesidade. Durante o desenvolvimento da obesidade, o ambiente inflamatório modula as ADSC de forma que se tornem 'estimuladores pró-inflamatórios', acompanhadas pela hipertrofia dos adipócitos, hipóxia, e na perda da homeostase e reparo do tecido adiposo. Em decorrência disso, ocorre um aumento na resposta inflamatória, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α e uma polarização de macrófagos do fenótipo M2 para o fenótipo M1, além do acúmulo de ADSC não funcionais, favorecendo a resistência à insulina e o desenvolvimento de síndrome metabólica. Abreviações: ASC: células tronco adipo-derivadas; IL: interleucina; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (Adaptado de Louwen, Ritter et al. 2018).

I.5 JUSTIFICATIVA

A obesidade está associada à alteração da composição e da estrutura do tecido adiposo. É uma disfunção metabólica que promove um ambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo sistêmico, e induz dano a macromoléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, gera um desequilíbrio na homeostasia energética e metabólica, paralela à disfunção do sistema imune e está intimamente associada com o surgimento prematuro de doenças naturalmente relacionadas ao envelhecimento. Essas premissas sugerem que o tecido adiposo pode ser estudado como um tecido endócrino, cujo funcionamento defeituoso pode comprometer o metabolismo do organismo de forma sistêmica.

Dados recentes publicados pelo nosso grupo evidenciaram os efeitos deletérios do ambiente tóxico presente na obesidade. Nossos resultados demonstram a modulação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) saudáveis a favor do fenótipo senescente, quando expostas ao plasma de indivíduos portadores de obesidade. Esse tratamento foi capaz de induzir disfunção crônica imunometabólica, explicada pela redução do consumo de oxigênio relacionada à síntese de ATP durante a respiração mitocondrial e regulação negativa do marcador CD28, fenótipo característico de linfócitos senescentes (Parisi et al. 2017).

Ademais, a literatura sugere que as ADSC presentes no tecido adiposo são os componentes fundamentais da disfunção imunometabólica, e que sua diferenciação em pré-adipócitos seria o fator desencadeante do estado inflamatório crônico, o qual repercute no organismo como um todo. Dessa forma, estudos que tenham como objetivo analisar fatores associados ao envelhecimento precoce e parâmetros

celulares e moleculares observado no contexto da obesidade, de modo a elucidar a conexão do acúmulo de danos macromoleculares de maneira sistêmica e a progressão do fenótipo senescente tornam-se pertinentes.

No contexto dessas premissas, nossa hipótese é que a obesidade esteja relacionada à um ambiente pró-inflamatório, pró-oxidativo e metabolicamente disfuncional que possa ser originado nas células tronco que compõem o tecido adiposo. Ainda, esse ambiente caracterizado por um estresse metabólico no tecido de origem pode ser um mecanismo chave na modulação de um fenótipo senescente em células do sistema imune periférico, de modo que possa contribuir para a aceleração do envelhecimento.

I.6 OBJETIVOS

I.6.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é avaliar parâmetros relacionados à homeostase metabólica e ao complexo telomérico associados ao fenótipo senescente em indivíduos portadores de obesidade.

I.6.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

Elaborar uma revisão bibliográfica narrativa sobre a estrutura e função do complexo telomérico e a associação com doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento.

Capítulo 2

Descrever o perfil de dano macromolecular (DNA, proteínas, lipídios), o estado redox no plasma, e a relação com a dinâmica do complexo telomérico, em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade.

Capítulo 3

Investigar a indução do fenótipo senescente relacionado à disfunção mitocondrial em células tronco adipo-derivadas expostas a um ambiente genotóxico crônico, característico da obesidade.

PARTE II

II.1 Capítulo 1: “Telomeres: chromosome end protective-complexes and its association with chronic diseases”

(Manuscrito publicado no periódico *Journal of Molecular and Cellular Biology Forecast*)

Journal of Molecular and Cellular Biology Forecast

Telomeres: Chromosome End Protective-Complexes and Its Association with Chronic Diseases

Grun LK^{1,2}, Pierdoná V^{1,2}, Guma FCR^{1,3} and Barbé-Tuana FM^{1,2,4*}

¹Postgraduate Program: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

²Group of Inflammation and Cellular Senescence at School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

³Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology of Lipids, Department of Biochemistry/ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

⁴Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

Abstract

Telomeres are specialized nucleoproteins present at the end of linear eukaryotic chromosomes. They consist of a double-stranded DNA sequence and a single strand DNA protrusion (free 3'OH end). Telomeres are assembled into a three-dimensional structure in association with the shelterin complex. Telomeres play a central role in chromosomal stability and proliferative history of the cells. Shortening of telomeres is considered an important marker of cellular aging shortening in a physiological way in each round of cell replication in somatic cells. More impressive, telomeres' attrition is highly susceptible to deterioration related to DNA damage accumulation during the aging process. Clinical evidence suggests that telomeres' shortening contributes to the establishment and progression of the aging phenotype in some inflammatory chronic disorders. In other cases, experimental evidences suggest that aging is accompanied with an abrupt shortening in the context of such diseases, proposing that the length of telomeres may be an important biological marker for progression of various pathologies.

Keywords: Aging; Telomeres; Telomerase; Shelterin complex; Chronic diseases

Abbreviations

AA: Aplastic Anemia; ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated; ATR: Ataxia Telangiectasia Rad3-related; B/F/B: Breakage/Fusion/Bridge cycles; BD: Bipolar Disorder; CCL11: C-C Motif Chemokine Ligand 11; CDKN1A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A; COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; CTC1: CST Telomere Replication Complex Component 1; DC: Dyskeratosis Congenita; DDR: DNA Damage Response; DKC1: Dyskerin; DNA: Deoxyribonucleic Acid; DSB: Double Strand Break; dsDNA: double-stranded DNA; Exo1: Exonuclease 1; HDR: Homology-Directed Repair; HHS: Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome; IPF: Idiopathic Pulmonary Fibrosis; kb: kilobase; NHEJ: Non-Homologous End Joining; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells; POT1: Protection of Telomeres 1; RAP1: Ras-Related Protein 1; RNA: Ribonucleic Acid; SSB: Single Strand Break; ssDNA: single-stranded DNA; STN1: STN1 subunit of CST complex; SZ: Schizophrenia; TCAB1: Telomerase Cajal Body Protein 1; TEN1: TEN1 subunit of CST complex; TERC: Telomerase RNA Component; TERT: Telomerase Reverse Transcriptase; TIN2: TRF1 Interacting Nuclear Factor 2; TP53: Tumor Protein P53; TPP1: Tripeptidyl Peptidase 1; TRF1: Telomeric Repeat Binding Factor 1; TRF2: Telomeric Repeat Binding Factor 2

History of the Telomeres

The possibility of the presence of specialized structures at the end of the chromosomes emerged in 1938 when Herman Muller observed that X-rays could cause breaks in the chromosomes of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and that the fusions did not occur at the ends of the chromosomes [1]. Simultaneously, in an independent study, Barbara McClintock observed a similar process after induction of chromosomal breaks in corn species [2]. The ability to avoid fusion of their ends led to the conclusion that the chromosomes were protected by some structure, called by Muller telomeres.

Years later, Leonard Hayflick observed *in vitro* that mouse fibroblasts had limited proliferative potential and accumulated aging-related characteristics, suggesting that these cells were not able to

OPEN ACCESS

*Correspondence:

Barbé-Tuana FM. Group of Inflammation and Cellular Senescence, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12D Sala 401.08A, Porto Alegre (RS), Brazil.

Tel: +55 (51) 3353-6037

E-mail: florenca.tuana@pucrs.br

Received Date: 11 Apr 2019

Accepted Date: 30 Apr 2019

Published Date: 07 May 2019

Citation: Grun LK, Pierdoná V, Guma FCR, Barbé-Tuana FM. Telomeres: Chromosome End Protective-Complexes and Its Association with Chronic Diseases. *J Mol Cell Biol Forecast*. 2019; 2(2): 1018.

Copyright © 2019 Barbé-Tuana FM. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

divide indefinitely. The critical moment of cell cycle arrest was called the "Hayflick limit" [3]. A few years later, studies on the properties of the DNA semi-conservative replication process [4,5] revealed particularities that corroborated Hayflick's theory of senescence.

In 1978, Elizabeth Blackburn and Joe Gall observed the repetition of the 5'-TTGGGG-3' hexamer at the DNA molecules on chromosome ends through sequencing the macro nuclear genome of *Tetrahymena* [6]. In 1982, Jack Szostak confirmed the conservation of telomere function throughout the evolution of the species, demonstrating that the linearization of yeast circular DNA could be stabilized after recombination with the telomere sequence of the protozoan *Tetrahymena* [7]. Since that, several studies emerged with the intention to investigate the function of telomeres biology and its association with diseases.

Structure and Function

Telomeres consist of a non-coding nucleotide sequence, composed by a double-stranded DNA sequence and a single strand DNA protrusion composed of 150-200 nucleotides (Figure 1), stabilized by proteins that forms an intricate structure, preventing telomeres been recognized as a single (SSB) or double DNA Strand Breaks (DSB). The single-stranded DNA (ssDNA) overhang consists of guanine-rich repeats at the 3'OH end, called the G-strand. The complementary 5' strand is rich in cytosine and named as C-strand [8].

The molecular analysis demonstrates that telomeric DNA forms a stable structure, in which the 3OH overhang is rearranged, inserting into the double-stranded DNA (dsDNA), forming a lariat structure, called the T-loop [9]. The final, single-stranded portion of the T-loop is protected by the ssDNA, disrupting base pairing between the double helix, forming a portion of triple-stranded DNA, called the D-loop (Figure 2) [10]. This specialized structure prevents the 3OH overhang from being recognized as an SSB, thus inhibiting the activation of the DNA Damage Response (DDR)-signaling machinery induced by Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and Ataxia Telangiectasia Rad3-related (ATR), key pathways that promote end-to-end fusion by Homology-Directed Repair (HDR) and Non-Homologous End Joining (NHEJ) [11].

The number of replicates of the telomeric sequence widely diverse between species, but its sequence is highly conserved in eukaryotic [12]. In mammals, the nucleotide sequence consists of the TTAGGG tandemly repeated hexamer, but the number of replicates is also variable between tissues and cells within the same organism. In humans, the size of telomeres can vary between 10-15 kilobases (kb) in early life, and even in some mouse strains, which can be as long as 40-80kb [13].

Thus, telomeres play an important role in protecting the genome against nucleolytic degradation, spontaneous recombination, repair events that result in chromosomal fusion and preventing SSB/DSB [14]. Moreover, telomeres are essential regulators of chromosomal positioning and cellular replicative capacity [15], conferring chromosomal stability and maintenance of genomic homeostasis.

The telomerase enzyme

In the early 1970s, Alexey Olovnikov hypothesized that a particular enzyme might be able to compensate for the loss of nucleotides resulting from the end replication problem [5]. In this sense, Telomerase was first described in 1987 by Carol Greider and

Elizabeth Blackburn [16]. Telomerase is a reverse transcriptase enzyme responsible for the *de novo* synthesis of the telomeric DNA, being the main physiological mechanism by which mammalian cells extend their telomeres. In humans, telomerase adds the TTAGGG hexamer to the 3'OH overhang at the end of linear chromosomes [17].

The telomerase catalytic core is a ribonucleoprotein complex composed of a polypeptide subunit termed Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) and a Telomerase RNA Component (TERC) belonging to the non-coding RNA family [18] (Figure 3). Telomerase activity counteracts the natural shortening of telomeres associated with cell replication and DNA degradation events [19]. Its up-regulation or mutation is a strategy described in major types of cancers for unlimited replicative capacity [20]. Biogenesis and maturation of the telomerase complex, formed by its two major TERT and TERC subunits, occurs through associations with specific proteins and domains in the Cajal body [18], a highly conserved organelle specialized in the maturation of ribonucleoproteins [13]. After assembly of the functional holoenzyme, additional proteins, such as TPP1, TIN2 regulate the recruitment of TERT to the 3'OH free end of the G-rich leading strand, a process facilitated by the Telomerase Cajal Body Protein 1 (TCAB1) [21-24] and Dyskerin (DKC1), that interacts with specific non-coding RNA domains, conferring stability to the structure [25]. The telomerase complex is further associated with components that assure its *in vivo* activity. In this regard, the shelterin proteins are interconnected ss and dsDNA, assisting with the holoenzyme recruitment and activity [26,27].

The shelterin complex

The ends of the chromosomes are protected by a complex consisting of six DNA binding proteins, called the shelterin complex, which in turn associates with other proteins, and complexes (Figure 2), conferring structure stabilization and controlling the length of the telomeric DNA [28].

Telomeric Repeat Binding Factor 1 (TRF1) and 2 (TRF2) are independent proteins that bind to DNA in association with the protein of Protection of Telomeres 1 (POT1) and interact with the telomeric sequence, forming dimers or multimers [29]. The TRF1, TRF2, and POT1 proteins interact through a bridge formed by two other proteins, the Tripeptidyl Peptidase 1 (TPP1) protein and the TRF1 Interacting Nuclear Factor 2 (TIN2), which do not bind directly to the DNA strand [12]. The sixth component of the shelterin complex, the Ras-Related Protein Rap1 (RAP1), is the evolutionarily most conserved protein in the complex, interacting exclusively with TRF2 [26].

The formation of TRF1 protein homodimers with double-stranded telomeric DNA is presumed to monitor sequence length, whereas homodimers formed by the TRF2 protein are able to stabilize T-turn formation by protecting the 3OH ribbon protrusion from the G-strand [30]. TRF1 also may act as an inhibitor of the telomerase enzyme, preventing the elongation of the telomeric DNA [29].

The TIN2 protein binds to the complex formed by TRF1 and TRF2 in association with double-stranded DNA, bridging with POT1 through TPP1. POT1 is the only protein in the shelterin complex that binds to the 3'OH protrusion of the G-strand. Thus, the six-component polypeptides of the complex form two compartments with the telomeric structure. In one, the proteins are bound only to double-stranded DNA, while in the other; the proteins are bound in both the double-stranded telomeric region and the 3OH protrusion

of the G-stranded ribbon [12].

The TRF1 protein has the function of controlling the size of telomeres through the maintenance of telomeric region replication [31,32]. Studies have demonstrated that TRF1 assists in the maintenance and direct regulation of telomere length by interacting with TIN2, TPP1 and POT1 proteins [33], and its depletion is related to increased DNA damage response, accelerating the aging phenotype [34]. The TRF2 protein stabilizes the T-loop in the telomeres by modifying DNA topology induced by positive super coiled conformational structures that protect the 3'OH overhang from NHEJ, directly suppressing ATM-dependent DDR signaling [35-37].

In addition, the interaction of the RAP1 and POT1 proteins is responsible for preventing events of homologous recombination [30]. In humans, the association of RAP1 with telomeres is stabilized by the TRF2 protein [38], with the auxiliary function of preventing homologous recombination and preventing telomere elongation independent of telomerase action. The interaction of TPP1 and POT1 also plays a suppressive role in homologous recombination [26], and in the inhibition of pathways that activate DDR [29]. In addition, other components of the shelterin complex may limit the bioavailability of POT1 in the telomeric structure, depending on the amount of the dimer formed by the binding between TPP1 and TIN2 [26]. Overexpression of TIN2 inhibits telomeres' elongation in human cells of the immune system, whereas inhibition of the gene encoding that protein results in uncontrolled elongation of the telomeric sequence. In addition, it has been suggested that the binding of TIN2 to TRF1 induces changes in the formation of TRF1, favoring the structure of telomeres, making it inaccessible to the action of telomerase [39].

Mutations in the genes encoding the proteins of the shelterin complex can cause recombination of telomeric DNA strands, leading to telomere dysfunction, cell cycle arrest, and apoptosis [40]. Evidences have been suggested that the shelterin binding requires a minimum telomeric DNA length in order to maintain regulatory functions and telomere protection [41]. Thus, the integrity and function of telomeres are directly associated with the complex, as well as the bioavailability of each component and its interactions.

Telomeres' replication

Linear chromosomes from eukaryotic organisms have protrusions at the 3'OH ends [42]. The leading strand is continuously extended in a 5'-3' direction towards the replication fork opening. However, the lagging strand is discontinuously synthesized by multiple small DNA fragments, called Okazaki fragments [43] and need additional exonuclease and DNA ligase1 activities to stabilize the newly formed strand [44,45]. In this sense, due to the inability of the DNA polymerase to completely replicate the discontinuous strand at the very last distal Okazaki fragment, the DNA replication machinery generates a 3'OH overhang at the end of the process [46]. This natural cellular process, called end replication problem, was first described by Jim Watson, who noticed the progressive loss of nucleotides at the 3'OH end of the chromosomes, within each cell division [4]. Physiologically, the number of nucleotides that are removed from each cell division is not constant and depends on several factors, such as the position and size of the nucleotide sequence of the last RNA primer and the length of the DNA sequence [46].

In addition to the end replication problem, mammalian telomeres

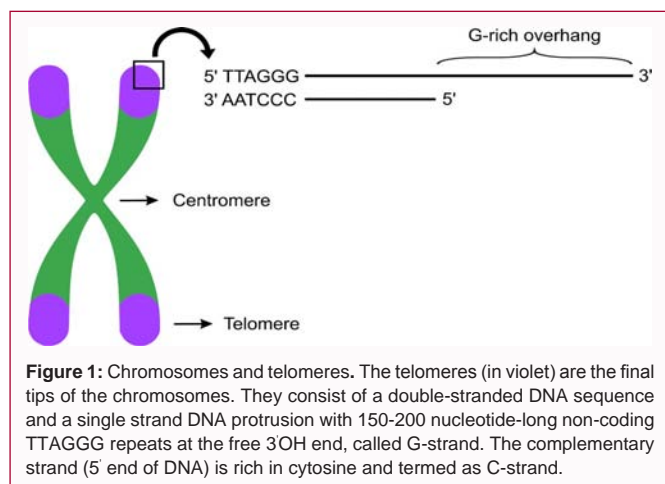
are also shortened through a 3'OH nucleases- dependent resections accomplishment mechanism. After DNA replication process, TRF2 recruits both nucleases Apollo and Exo1 in order to resect the leading and lagging ends on telomere DNA, and Exo1 to generate a functional 3'OH overhang as a multi-step, shelterin-controlled process [47]. Afterward, POT1 directs the overhang fill-in synthesis in late S phase by the recruiting Pol- α through a three-protein complex named CST, composed by CTC1, STN1 and TEN1 proteins [48].

Telomeres as markers of biological age

As in mammals, telomerase activity is the major mechanism to avoid excessive telomeres' attrition; its expression and regulation are tightly modulated [49-53]. In this sense, although TERC subunit is ubiquitously expressed in mammal tissues, TERT subunit is only expressed in most embryonic stem cell compartments, germ-line and cancer cells, and necessary for counteracting excessive telomeres' attrition [54-57]. Some embryonic stem cells, such as hematopoietic precursors, are characterized by reduced telomerase activity, allowing partial compensation of telomeres shortening. Somatic cells, such as differentiated circulating immune system cells, are generally characterized by the absence of telomerase activity by suppressing TERT expression, implying in limited proliferative capacity [58].

Thus, the natural process of telomere shortening may represent the pace or rhythm of the aging process and can be compared to a mitotic clock, reflecting the proliferative history of the cells [14]. This definition suggests that the length of telomeres and their shortening rate could be considered a biological age marker, both at the cellular and systemic status, representing an objective measure of events accumulated over organism's lifespan. In this regard, the accelerated attrition of the telomeric sequence could be associated with a potential biomarker related to the early onset of aging [59].

Telomeres homeostasis is species-dependent and tissue-specific. Its shortening rate varies with age and cell type [60]. During embryonic development of vertebrates, telomere length remains constant in most tissues by active telomerase. However, after birth, somatic cells undergo progressive telomeres shortening due to telomerase inactivation through regulation [61]. In this way, variations in the rate of telomeres attrition are directly correlated with its proliferative capacity. For example, high self-renewal tissues, such as intestinal mucosal and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), are associated with accelerated shortening of their telomeres. On the other hand, tissues with lower turnover, such as neurons and myocytes, are characterized by attenuated telomeres' attrition [62]. As mentioned before, the successive loss of nucleotides at each cell replication cycle is a physiological process. However, as we have seen, when telomeres reach a critical length, it may induce DDR signaling, resulting in cell cycle arrest and the transcription of genes that activate cellular senescence pathways [63]. Indeed, cell cycle arrest is stabilized by signals that activate the TP53/CDKN1A (P53/P21) pathway, which induces ATM/ATR kinases recruited to the DNA damage foci [64]. Although the cells remain metabolically active, they do not proliferate [65]. At this point, somatic cells start to stimulate the transcription of genes necessary for cycle arrest, preventing the propagation of mutagenesis, and tumor development as a consequence [9]. Consequently, these cells raise senescence-induced phenotypic changes promoting a shift in their metabolism [65]. However, cells may recover their proliferative rate by TP53 gene suppression or mutation, circumventing cell cycle regulation and avoiding the senescent state [66]. In this way, the cells acquire



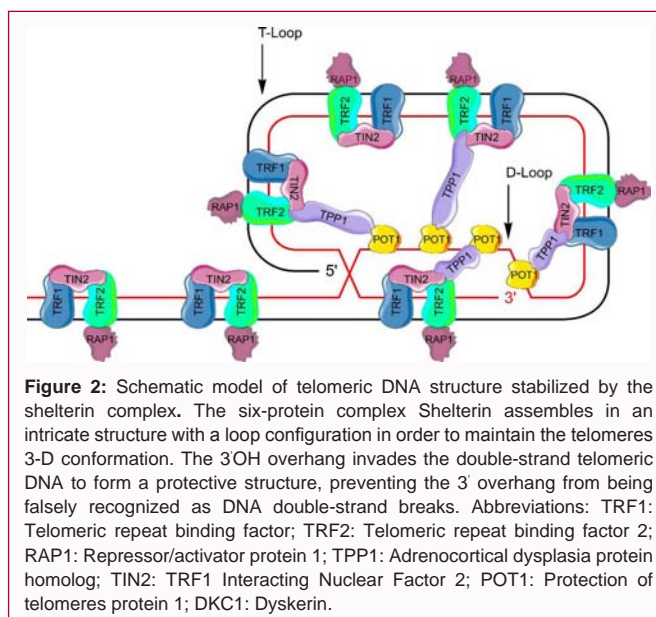
unlimited proliferative capacity, so that their telomeres shorten until reaching a critical point, being unable to protect the ends of the chromosomes. This process results in the emergence of chromosomal abnormalities, such as Homology-Directed Repair (HDR) and NHEJ, as well as anaphase bridges followed by Breakage/Fusion/Bridge (B/F/B) cycles that lead to high rates of apoptosis due to genomic instability [67,68].

Telomere dysfunction in human chronic diseases

The length of telomeres, the activity of the telomerase enzyme and the association of proteins of the shelterin complex are fundamental factors in the pathophysiology of several human diseases. Numerous studies indicate that aging-related diseases and early-age (progeria) syndromes are characterized by accelerated shortening of telomeres, which may compromise cell viability and the immunological potential through disease progression [14].

In particular, clinical evidence suggests that defect on telomeres biology and its maintenance machinery causally contributes to the establishment and progression of the aging phenotype in some diseases, termed telomeropathies. The onset and progression of these pathologies, such as Dyskeratosis Congenita (DC) [69], Aplastic Anemia (AA), Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) [70] and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome (HHS) are directly related to mutations on telomerase or shelterin genes and critically shortened telomeres [71,72]. Although CD, AA, IPF, and HHS are apparently different diseases with diverse clinical manifestations, they all share several characteristics, such as shortened telomeres as a causal effect. Thus, apparently heterogeneous phenotypes are caused by the same molecular defects or underlying mutations in the genes of the telomeric complex [73].

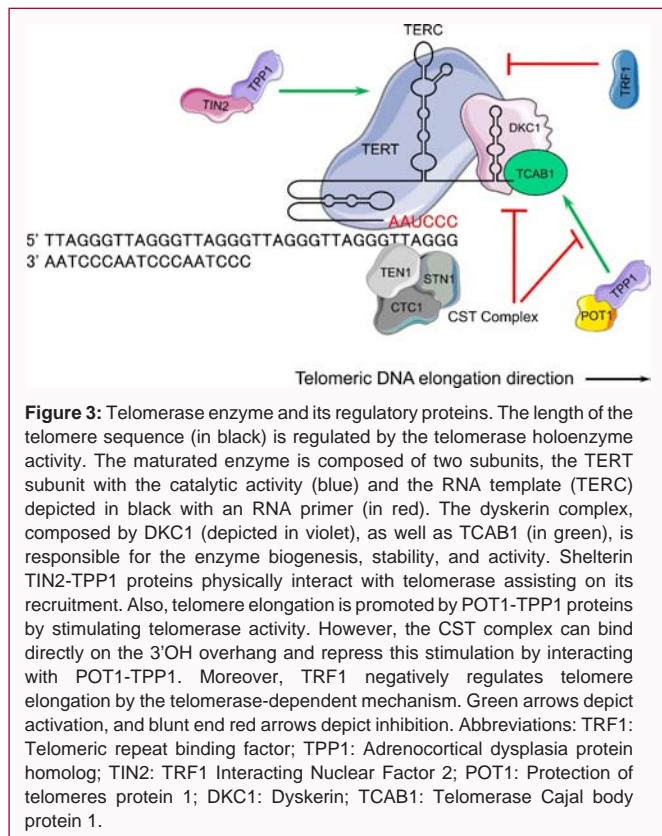
On the other hand, recent studies suggest that various chronic diseases, such as cardiovascular diseases [74], diabetes mellitus [75], metabolic syndromes [76-78], Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and severe asthma [79-82], among others are associated with accelerated shortening of telomeres regardless of their individual biological age [70]. Chronic metabolic disorders share important characteristics and are associated with an immune system dysfunction leading to a chronic pro-inflammatory status that is closely related to the onset and persistence of such diseases [83]. These conditions are highly modulated by inflammation, oxidative stress and environmental factors, which can contribute to telomere dysfunction. The pro-inflammatory milieu triggers cellular proliferation and cell turnover, thus promoting an accelerated



shortening of telomeres. However, a pro-oxidant imbalance can also promote DSB and DDR on telomeric DNA regions, resulting in telomere shortening [70].

Increasing evidence demonstrates that comorbidities and chronic inflammation related to obesity are associated with shortened telomeres [84-86]. In this sense, we demonstrated that telomere shortening in the context of obesity is related to the condition itself, independently of comorbidities occurrences. We also observed a dysregulation on shelterin components, where TRF1 negatively contributed to telomeres' attrition [32]. Additionally, we describe chronic detrimental effects from the plasma of patients with obesity. Our findings demonstrate an immunosenescent phenotype characterized by increasing mitochondrial dysfunction and DNA damage associated with augmented apoptosis on PBMC from a eutrophic donor by supplementation with plasma from patients with obesity [87]. Longitudinal studies have focused on the effects of bariatric surgery on telomere shortening rate. In this context, Laimer *et al.* observed an increase in telomeres length in PBMC after 10 years of bariatric procedure [88]. On the other hand, Formichi *et al.* observed shorter telomeres on obese patients with no effect 12 months after intervention [89]. Literature controversy is supported by our recent review with meta-analysis comprising 119,439 patients from 39 original studies, where we demonstrate inconclusive results with a trend towards a negative correlation for obesity and telomere shortening [90].

Moreover, our studies on psychiatric diseases, such as Bipolar Disorder (BD), show shortened telomeres in individuals diagnosed with BD [91]. More interestingly, when we compared the telomere length of these individuals with their non-BD siblings and with unrelated healthy individuals; we found a progressive order of degeneration between groups. In this sense, shorter telomeres on PBMC were associated with an increased pro-inflammatory profile in BD carriers [92]. When we replicated this work in individuals with another severe neurodegenerative disease, such as Schizophrenia (SZ), we also observed increased senescence profile on cells marked by telomere attrition. However, when we analyzed the telomeres length in the same three groups, we observed that both SZ individuals and their siblings had telomeres of similar length and shorter than



unrelated healthy individuals. These results highlight a pathological profile of premature aging possibly present in the course of SZ and suggest that the length of telomeres could be an endophenotype present in individuals at risk [93]. Finally, in the last work, we demonstrated a positive association between telomere length and CCL11, a peripheral biomarker associated with inflammation in aging. We further describe negative associations between telomere length and gray matter volume or recent memory episodes in subjects with SZ [94]. Although all these studies are cross-sectional, the results of this set are consistent with the hypothesis of disease-induced accelerated disease (BD or SZ) rather than age.

Still, the reflex of the exposure to adverse situations on the length of telomeres can be detected even in childhood. Studies show an association between the shortening of telomeres and the occurrence of childhood obesity [95], as well as being related to low socioeconomic status [96] and exposure to psychological stress [97]. In a longitudinal study that followed children exposed to violence for five years, the rate of shortening of telomeres persisted, suggesting that events early in life may cause chronic alterations, increasing the risk of diseases in adulthood [98]. Other studies have shown that premature rupture of membranes is related to the shortening of leukocyte telomeres already in the fetal period [99,100]. In addition, there is evidence that adverse events during pregnancy may be associated with shortening of leukocyte telomeres in newborns [101], and in young adults [102].

Several studies have also shown that lifestyle factors, such as smoking [103], alcoholism [104], exposure to environmental pollution [105], beverage drinks consumption [106], socioeconomic status, as well as other diseases associated with chronic inflammation, and biochemical [107] or psychological stress events [108] directly influence the health and life expectancy of individuals. These might potentially accelerate the shortening rate of telomeres from PBMC,

increasing the risk of developing several types of cancer and the rate of aging, leading to a senescence phenotype or inducing cell death [14].

There is also evidence in the literature for interventions that can reverse the accelerated rate of telomeres shortening. As an example, many programs have focused on modifying individuals' comprehensive lifestyle changes. In a three-month follow-up study of patients with prostate cancer, lifestyle change, including a balanced diet, follow-up by group therapy, moderate physical activity, and control of stress levels, contributed to the elongation of the telomeric sequence, decreasing the acceleration of the aging process [109].

Conclusions

The elucidation of the complexity of replication and regulation of the structure of telomeres is a fascinating focus of basic research involving cell biology. Telomeres are cell structures associated with biological aging and are regulated by a network of complexes formed by specialized proteins, conferring stability to the sequence. Thus, telomeres are structures that play a fundamental role in chromosomal stability, avoiding the triggering of DNA damage responses to the genome of organisms, avoiding nucleolytic events during the progression of the aging process.

According to Lopez-Otín, shortening of telomeres is considered an important marker of the aging process, since this structure is highly susceptible to deterioration and related to the accumulation of DNA damage during the aging process [110]. Thus, structural or mutagenic deficiencies in the components of the shelterin complex are capable of causing a destabilization of the telomeric DNA structure, promoting structure unblocking [111] and accelerated shortening of telomeres [112].

In addition, experimental evidence suggests that telomeres shortening, DDR activation, and cellular senescence contribute to the establishment and progression of the aging phenotype. One hypothesis about aging is that abrupt shortening occurs early in the disease, suggesting that the length of telomeres may be an important biological marker in the establishment and progression of various pathologies [113].

Studies between the telomeres of cell biology and human diseases are complex. In addition, they require a deepening and holistic multidisciplinary approach in order to comprehensively understand clinically relevant data. Although the role of telomeres in cell physiology is of paramount importance during tumorigenesis, many studies have focused on much broader efforts, addressing a spectrum of complex diseases. Thus, this type of multidisciplinary approach can allow the discovery of effective therapeutic modalities and the prevention of diseases related to the acceleration of the biological aging process.

References

1. Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collecting net*. 1938; 13: 182-198.
2. McClintock B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1939; 25: 405-416.
3. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961; 25: 585-621.
4. Watson JD. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*. 1972; 239: 197-201.

5. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973; 41: 181-190.
6. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol.* 1978; 120: 33-53.
7. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell.* 1982; 29: 245-255.
8. Kazda A, Zellinger B, Rossler M, Derboven E, Kusenda B, Riha K. Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev.* 2012; 26: 1703-1713.
9. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 531-557.
10. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010; 75: 1563-1583.
11. Herbig U, Sedivy JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127: 16-24.
12. Nelson AD, Shippen DE. Blunt-ended telomeres: an alternative ending to the replication and end protection stories. *Genes Dev.* 2012; 26: 1648-1652.
13. Nandakumar J, Cech TR. Finding the end: recruitment of telomerase to telomere. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 69-82.
14. Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14: 28- 34.
15. Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, et al. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1259-1268.
16. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987; 51: 887-898.
17. Hukezalie KR, Wong JM. Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *FEBS J.* 2013; 280: 3194-3204.
18. Rubtsova MP, Vasilkova DP, Malyavko AN, Naraikina YV, Zvereva MI, Dontsova OA. Telomere lengthening and other functions of telomerase. *Acta Naturae.* 2012; 4: 44-61.
19. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell.* 2001; 106: 661-673.
20. Conomos D, Pickett HA, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture. *Front Oncol.* 2013; 3: 27.
21. Egan ED, Collins K. Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. *RNA.* 2012; 18: 1747-1759.
22. Zaug AJ, Podell ER, Nandakumar J, Cech TR. Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. *Genes Dev.* 2010; 24: 613-622.
23. Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature.* 2012; 492: 285-289.
24. Frank AK, Tran DC, Qu RW, Stohr BA, Segal DJ, Xu L. The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres. *PLoS Genet.* 2015.
25. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 209-220.
26. Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Rep.* 2017; 18: 41-53.
27. Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, OueNzar F, Querido E, Wellinger RJ, et al. Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongating telomeres. *Mol Cell.* 2011; 44: 819-827.
28. Sfeir A. Telomeres at a glance. *J Cell Sci.* 2012; 125: 4173-4178.
29. Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus.* 2011; 2: 119-135.
30. Xin H, Liu D, Songyang Z. The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol.* 2008; 9: 232.
31. Wu Y, Xiao S, Zhu XD. MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14: 832-840.
32. Grun LK, Teixeira NDR Jr, Mengden LV, de Bastiani MA, Parisis MM, Lavandoski P, et al. TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. *Free Radic Biol Med.* 2018; 129: 286-295.
33. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, Mac Rae SL, Kariseder J, Schildkraut CL, et al. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell.* 2009; 138: 90-103.
34. Marion RM, Lopez de Silanes I, Mosteriro L, Gamache B, Abad M, Guerra C, et al. Common Telomere Changes during *In Vivo* Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis. *Stem Cell Reports.* 2017; 8: 460-475.
35. THE A.M.A. has adopted a resolution which may spell an end to the problem of corporate medicine vs private practice. *NY Med.* 1950; 6: 21-25.
36. Okamoto K, Bartocci C, Ouzounov I, Diedrich JK, Yates JR, Denchi EL. A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature.* 2013; 494: 502-505.
37. Benarroch-Popivker D, Pisanio S, Mendez-Bermudez A, Lototska L, Kaur P, Bauwens S, et al, TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Mol Cell.* 2016; 6: 274-286.
38. Martinez P, Thanasoula M, Carios AR, Gomez-Lopez G, Tejera AM, Schoeftner S, et al. Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat Cell Biol.* 2010; 12: 768-780.
39. Hockemeyer D, Collins K. Control of telomerase action at human telomeres. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22: 848-852.
40. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005; 19: 2100-2110.
41. Martinez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 161-176.
42. Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma.* 2006; 115: 413-425.
43. Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugino A, Sugimoto K. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968; 59: 598-605.
44. Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LM. *Biologia Molecular Básica-5.* Artmed Editora. 2014.
45. Burgers PM, Kunkel TA. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu Rev Biochem.* 2017; 86: 417- 438.
46. Wellinger RJ. In the end, what's the problem?. *Mol Cell.* 2014; 53: 855-856.
47. Wu P, Takai H, de Lange T. Telomeric 3' overhangs derive from resection

- by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell*. 2012; 150: 39-52.
48. Bernal A, Tusell L. Telomeres: Implications for Cancer Development. *Int J Mol Sci*. 2018.
49. Lewis KA, Tollefsbol TO. Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Subunit through Epigenetic Mechanisms. *Front Genet*. 2016; 7: 83.
50. Sandhu R, Wei D, Sharma M, Xu L. An N-terminal Flag-tag impairs TPP1 regulation of telomerase function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 512: 230-235.
51. Schmidt JC, Dalby AB, Cech TR. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *Elife*. 2014; 3.
52. Abreu E, Aritonovska E, Reichenbach P, Cristofair G, Culp B, Terns RM, et al. TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol Cell Biol*. 2010; 30: 2971-2982.
53. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012; 336: 1549-1554.
54. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 611-622.
55. Rane JK, Greener S, Frame FM, Mann VM, Simms MS, Collins AT, et al. Telomerase Activity and Telomere Length in Human Benign Prostatic Hyperplasia Stem-like Cells and Their Progeny Implies the Existence of Distinct Basal and Luminal Cell Lineages. *Eur Urol*. 2016; 69: 551-554.
56. Ishaq A, Hanson PA, Morris CM, Saretzki G. Telomerase Activity is Downregulated Early During Human Brain Development. *Genes (Basel)*. 2016; 7: 27.
57. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996; 18: 173-179.
58. Hornsby PJ. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol*. 2007; 42: 575-581.
59. Butt HZ, Atturu G, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Telomere length dynamics in vascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010; 40: 17-26.
60. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 2002; 69: 188-197.
61. Monaghan P, Haussmann MF. Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan?. *Trends Ecol Evol*. 2006; 21: 47-53.
62. Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawade M, Arai T, Kato M, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol*. 2002; 37: 523-531.
63. Prescott J, Wentzensen IM, Savage SA, De Vivo I. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res*. 2012; 730: 75-84.
64. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol*. 2012; 41: 1561-1569.
65. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 349-353.
66. Burns DM, Richter JD. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev*. 2008; 22: 3449-3460.
67. Zou Y, Misri S, Shay JW, Pandita TK, Wright WE. Altered states of telomere deprotection and the two-stage mechanism of replicative aging. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 2390-2397.
68. Bailey SM, Murnane JP. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: 2408-2417.
69. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999; 402: 551-555.
70. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J*. 2013; 280: 3180-3193.
71. Martinez P, Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Biol*. 2017; 216: 875-887.
72. Holohan B, Wright WE, Shay JW. Cell biology of disease: Telomeropathies: an emerging spectrum disorder. *J Cell Biol*. 2014; 205: 289-299.
73. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 693-704.
74. Sanders JL, Fitzpatrick AL, Boudreau RM, Arnold AM, Aviv A, Kimura M, et al. Leukocyte telomere length is associated with noninvasively measured age-related disease: The Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; 67: 409-416.
75. Salpea KD, Humphries SE. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*. 2010; 209: 35-38.
76. Revesz D, Milaneschi Y, Verhoeven JE, Penninx BW. Telomere length as a marker of cellular aging is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: 4607-4615.
77. Revesz D, Milaneschi Y, Verhoeven JE, Penninx BW. Longitudinal Associations Between Metabolic Syndrome Components and Telomere Shortening. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100: 3050-3059.
78. Revesz D, Verhoeven JE, Picard M, Lin J, Sidney S, Epel ES, et al. Associations Between Cellular Aging Markers and Metabolic Syndrome: Findings From the CARDIA Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018; 103: 148-157.
79. Albrecht E, Sillanpaa E, Karrasch S, Alves AC, Codd V, Hovatta I, et al. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur Respir J*. 2014; 43: 983-992.
80. Kyoh S, Venkatesan N, Poon AH, Nishioka M, Lin TY, Baglole CJ, et al. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132: 480-482.
81. Belsky DW, Shalev I, Sears MR, Hancox RJ, Lee Harrington H, Houts R, et al. Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife?. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 190: 384-391.
82. Cordoba-Lanus E, Carzorla-Rivero S, Espinoza-Jimenez A, de-Torres JP, Pajares MJ, Aguirre-Jaime A, et al. Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort. *Respir Res*. 2017; 18: 59.
83. Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr Opin Immunol*. 2014; 29: 23-28.
84. Aulinas A, Ramirez MJ, Barahona MJ, Valassi E, Resmini E, Mato E, et al. Dyslipidemia and chronic inflammation markers are correlated with telomere length shortening in Cushing's syndrome. *PLoS One*. 2015; 10.
85. Strazhesko I, Tkacheva O, Boytsov S, Akasheva D, Dudinskaya E, Vygodin V, et al. Association of Insulin Resistance, Arterial Stiffness and Telomere Length in Adults Free of Cardiovascular Diseases. *PLoS One*. 2015; 10.
86. Bonfigli AR, Spazzafumo L, Praticchizzo F, Bonafe M, Mensa E, Micolucci L, et al. Leukocyte telomere length and mortality risk in patients with type 2 diabetes. *Oncotarget*. 2016; 7: 50835-50844.
87. Parisi MM, Grun LK, Lavandoski P, Alves LB, Bristot IJ, Mattiello R, et al. Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. *Obesity (Silver Spring)*. 2017; 25: 1523-1531.
88. Laimer M, Melmer A, Lamina C, Raschenberger J, Adamovski P, Engl J, et al. Telomere length increase after weight loss induced by bariatric

- surgery: results from a 10 year prospective study. *Int J Obes (Lond)*. 2016; 40: 773-778.
89. Formichi C, Cantara S, ciuoli C, Neri O, Chiofalo F, Selmi F, et al. Weight loss associated with bariatric surgery does not restore short telomere length of severe obese patients after 1 year. *Obes Surg*. 2014; 24: 2089-2093.
90. Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, et al. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)*. 2015; 23: 2165-2174.
91. Barbé-Tuana FM, Parisi MM, Panizzutti BS, Fries GR, Grun LK, Guma FT, et al. Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease. *Braz J Psychiatry*. 2016; 38: 281-286.
92. Vasconcelos-Moreno MP, Fries GR, Gubert C, Dos Santos BTMQ, Fijtman A, Sartori J, et al. Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017; 20: 445-454.
93. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, da Rosa ED, de Lucena D, Macedo D, et al. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophr Res*. 2016; 174: 39-42.
94. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, Grun LK, Barbé-Tuana FM, Teixeira AL, et al. Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *Schizophr Bull*. 2018; 44: 158-167.
95. Buxton JL, Walters RG, Visvikis-Siest S, Meyre D, Froguel P, Blakemore AI. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: 1500-1505.
96. Needham BL, Fernandez JR, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Socioeconomic status and cell aging in children. *Soc Sci Med*. 2012; 74: 1948-1951.
97. Drury SS, Theall K, Gleason MM, Smyke AT, De Vivo I, Wong JY, et al. Telomere length and early severe social deprivation: linking early adversity and cellular aging. *Mol Psychiatry*. 2012; 17: 719-727.
98. Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houtsb RM, Danese A, et al. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Mol Psychiatry*. 2013; 18: 576-581.
99. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, Taylor RN. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One*. 2012; 7.
100. Menon R, Boldgon I, Hawkins HK, Woodson M, Poletini J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated *in vitro*. *Am J Pathol*. 2014; 184: 1740-1751.
101. Entringer S, Epel ES, Lin j, Buss C, Shahbaba B, Blackburn HN, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 208: 134.
102. Entringer S, Epel ES, Lin j, Buss C, Shahbaba B, Blackburn HN, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 513.
103. Salihu HM, Pradhan A, King L, Paothong A, Nwoga C, Marty PJ, et al. Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 212: 205.
104. Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, Bertazzi PA, Snenghi R, Nalesso A, et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2011; 129: 983-992.
105. Zhang X, Lin S, Funk WE, Hou L. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occup Environ Med*. 2013; 70: 743-749.
106. Leung CW, Laraia BA, Needham BL, Rehkopf DF, Adler NE, Lin J, et al. Soda and cell aging: associations between sugar-sweetened beverage consumption and leukocyte telomere length in healthy adults from the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Am J Public Health*. 2014; 104: 2425-2431.
107. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O'Callaghan N, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One*. 2014; 9.
108. Chae DH, Nuru-Jeter AM, Adler NE, Brody GH, Lin J, Blackburn EH, et al. Discrimination, racial bias, and telomere length in African-American men. *Am J Prev Med*. 2014; 46: 103-111.
109. Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol*. 2008; 9: 1048-1057.
110. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153: 1194-1217.
111. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008; 42: 301-334.
112. Martinez P, Blasco MA. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell*. 2010; 9: 653-666.
113. Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*. 2010; 459: 259-268.

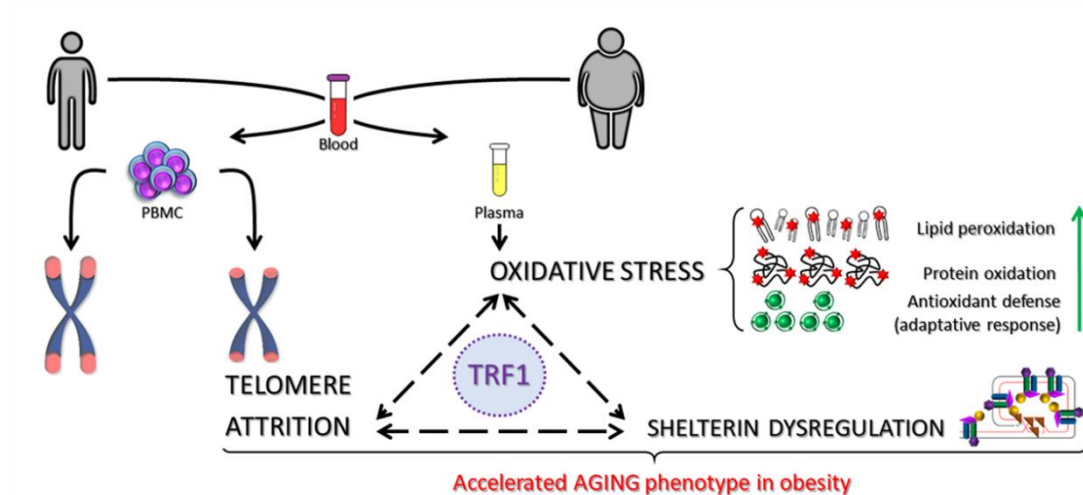
II.2 Capítulo 2: “TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity”

(Manuscrito publicado no periódico *Free Radical Biology & Medicine*)

TRF1 AS A MAJOR CONTRIBUTOR FOR TELOMERES' SHORTENING IN THE CONTEXT OF OBESITY

Lucas Kich Grun, Nevtton da Rosa Teixeira, Lúcia von Mengden, Marco Antônio de Bastiani, Mariana Migliorini Parisi, Rafael Bortolin, Patrícia Lavandoski, Vinícius Pierdoná, Letícia Biscaino Alves, José Cláudio Fonseca Moreira, Cláudio Corá Mottin, Marcus Herbert Jones, Fábio Klamt, Alexandre Vontobel Padoin, Fátima Costa Rodrigues Guma, Florencia María Barbé-Tuana

Graphical abstract:



Highlights:

- Shorter telomere length is associated with accelerated aging in obesity;
- Upregulation of regulatory genes associated to telomeres' length in obesity;
- Adaptive antioxidant response were insufficient to counter-act telomere attrition;
- TRF1 as a major contributor for telomeres uncapping in the context of obesity.



Original article

TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity



Lucas Kich Grun^{a,b}, Newton da Rosa Teixeira Jr.^{a,b}, Lúcia von Mengden^{a,c}, Marco Antônio de Bastiani^{a,c}, Mariana Migliorini Parisi^d, Rafael Bortolin^e, Patrícia Lavandoski^{a,b}, Vinícius Pierdoná^{a,b}, Letícia Biscaino Alves^f, José Cláudio Fonseca Moreira^{a,g}, Cláudio Corá Mottin^{f,h}, Marcus Herbert Jones^h, Fábio Klant^{a,c}, Alexandre Vontobel Padoin^f, Fátima Costa Rodrigues Guma^{a,b,i}, Florencia María Barbé-Tuana^{a,b,j,*}

^a Postgraduate Program: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Group of Inflammation and Cellular Senescence and Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, Department of Biochemistry/ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry/ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Interdisciplinary Group of Health (GIS), Center of Education and Research of the Institute of Cardiology of Cruz Alta, University of Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta, Brazil

^e Department of Civil and Environmental Engineering, Universidad de la Costa, Barranquilla, Atlántico, Colombia

^f Center of Obesity and Metabolic Syndrome, São Lucas Hospital at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and Postgraduate Program: Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^g Laboratory of Cellular Stress, Department of Biochemistry/ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^h Laboratory of Respiratory Physiology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

ⁱ Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology of Lipids, Department of Biochemistry/ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^j Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aging
Obesity
Oxidative stress
Shelterin complex
Telomere length
TRF1

ABSTRACT

Obesity is a prevalent multifactorial chronic disorder characterized by metabolic dysregulation. Sustained pro-oxidative mediators trigger harmful consequences that reflect at systemic level and contribute for the establishment of a premature senescent phenotype associated with macromolecular damage (DNA, protein, and lipids). Telomeres are structures that protect chromosome ends and are associated with a six-protein complex called the shelterin complex and subject to regulation. Under pro-oxidant conditions, telomere attrition and the altered expression of the shelterin proteins are central for the establishment of many pathophysiological conditions such as obesity. Thus, considering that individuals with obesity display a systemic oxidative stress profile that may compromise the telomeres length or its regulation, the aim of this study was to investigate telomere homeostasis in patients with obesity and explore broad/systemic associations with the expression of shelterin genes and the plasma redox state. We performed a cross-sectional study in 39 patients with obesity and 27 eutrophic subjects. Telomere length (T/S ratio) and gene expression of shelterin components were performed in peripheral blood mononuclear cells by qPCR. The oxidative damage (lipid peroxidation and protein carbonylation) and non-enzymatic antioxidant system (total radical-trapping antioxidant potential/reactivity, sulfhydryl and GSH content) were evaluated in plasma. Our results demonstrate that independently of comorbidities, individuals with obesity had significantly shorter telomeres, augmented expression of negative regulators of the shelterin complex, increased lipid peroxidation and higher oxidized protein levels associated with increased non-enzymatic antioxidant defenses. Principal component analysis revealed TRF1 as a major contributor for firstly telomeres shortening. In conclusion, our study is first showing a comprehensive analysis of telomeres in the context of obesity, associated with dysregulation of the shelterin components that was partially explained by TRF1 upregulation that could not be reversed by the observed adaptive non-enzymatic antioxidant response.

* Correspondence to: School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: florencia.tuana@pucrs.br (F.M. Barbé-Tuana).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.039>

Received 6 September 2018; Accepted 24 September 2018

Available online 27 September 2018

0891-5849/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity, recognized as a multifactorial chronic disorder, is the most prevalent non-communicable disease (NCD) and a preventable condition that has tripled since 1975, affecting more than 650 million adults nowadays [1]. It constitutes a major risk factor for other comorbidities such as cardiovascular diseases, diabetes, musculoskeletal disorders, and some cancers. Obesity is associated with chronic inflammation and oxidative stress and besides contributing to the emergence of physiological imbalances, obesity accelerates aging and reduces lifespan [2].

Aging is a biological process characterized by the progressive deterioration of physiological functions, and some proposed hallmarks include increased genomic instability and telomere attrition [3]. Aging is also a risk factor for the appearance of comorbidities and augmented susceptibility to death [4,5]. Because obesity is an important risk factor for the development of many age-related diseases associated with low-grade systemic inflammatory status and oxidative stress (OS) [6], it seems reasonable to speculate that aging and the condition of obesity share common features. The theory of free radicals associated with aging [7] postulates that aging is the result of macromolecules (DNA, protein, and lipid) damage accumulation, mainly caused by mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production connected with the reduced ability of the organism to deal with these deleterious effects, that plays a significant role in the organism's lifespan.

Telomeres are specialized nucleoprotein structures located at the end of eukaryotic chromosomes. They are formed by a double-stranded tandemly repeated DNA sequence (TTAGGG) [8] followed by a G-rich 3'-single strand protrusion [9]. Telomeres play a critical role in the maintenance of genomic integrity [10,11]. The tridimensional structure of the telomeres is assembled in association with six telomere-specific proteins, named the shelterin complex, composed of TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, and RAP1. The shelterin complex binds to telomeric repeats and mediates the formation of an intricate structure sequestering the single-stranded telomeric DNA [12,13]. A proper function of the complex is necessary to avoid unwanted repair events and the induction of the DNA damage response (DDR).

Because telomere length (TL) shortens at each cycle of replication [14], TL has been considered a marker for biological aging [15]. Experimental and clinical studies have already established a causal relation between inflammation, OS [16] and TL [17]. We have recently published a review with meta-analysis to critically evaluate and summarize the scientific evidence about the effect of obesity on TL among 69 different studies. Our results showed a trend toward a negative correlation between obesity and shorter TL [18]. In addition, no study has yet addressed the interconnection between inflammation, oxidative stress (OS) and the shelterin components in a single report. Thus, considering that individuals with obesity have an augmented chronic systemic oxidative profile that may compromise the homeostasis of the telomeric region, the aim of this study was to investigate TL from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with obesity and explore its association with the expression of shelterin genes and the plasma redox state.

2. Methodology

The project was approved by the Research Ethics Committee of the Institutions under protocol number 760.537 (UFRGS) and 640.817 (PUCRS). Participants read, agreed and signed an informed consent.

We included 66 subjects with age ranging between 18 and 65 years old. Based on BMI (kg/m^2) [1], participants were divided into two groups. Individuals with severe or morbid obesity ($\text{BMI} \geq 35.0 \text{ kg}/\text{m}^2$) ($n = 39$) were recruited by convenience at the Center of Obesity and Metabolic Syndrome unit at São Lucas Hospital at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. The control group ($n = 27$) was composed of healthy eutrophic individuals ($18.5 \text{ kg}/\text{m}^2 \leq \text{BMI} \leq 24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$) who did not have any obesity associated comorbidity nor

cancer and were not alcohol or tobacco consumers.

2.1. Samples

PBMC were purified using Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA) from 10 mL of whole blood previously collected in tubes containing EDTA as an anticoagulant. Yield ($0.8\text{--}1.0 \times 10^6$ PBMC per 1 mL of whole blood from eutrophic patients and higher yield in the group of patients with obesity) and cell viability ($> 95\%$) were determined by trypan blue dye exclusion (Sigma-Aldrich). Plasma samples were stored at -80°C until use.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA (gDNA) was extracted from 0.5×10^6 PBMC using UltraPure Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol reagent (25:24:1, v/v, Sigma-Aldrich) and Proteinase K (2 mg/mL, Promega, USA) as previously described [19]. gDNA was stored at -20°C until use.

2.3. Relative telomere length

Relative telomere length was assessed as we previously described [20,21] with modifications from previous work [22]. For each sample, two qPCR reactions were performed – for the amplification of a telomere sequence (T) and for the single-copy autosomal gene, encoding the ribosomal acid phosphoprotein P0 36B4 (S) (Supplementary Table 1). Results were analyzed by the comparative cT (cycle threshold) method ($\Delta\Delta\text{cT}$) [23] and expressed as relative T/S ratio.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 1×10^6 PBMC using TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). RNA purity was assessed spectrophotometrically by absorbance at 260/280 nm in a BioPhotometer Plus (Eppendorf, Germany). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 μg of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) and stored at -20°C until use.

2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

All reactions were performed in triplicate using the Platinum® Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen) in a 96-well Real-Time PCR instrument StepOnePlus™ (Applied Biosystems). The specificity of the amplified products was confirmed by dissociation curves analyses at the end of each reaction. All plates included two different controls: a negative control, to detect possible contamination of the reagents or false-positive in the absence of sample and a random sample to monitor the interplate variation and used to obtain a normalizing factor to compare inter-plate variation. Triplicates with standard deviation ≥ 0.3 cT were excluded and rerun.

Gene sequence information was collected (www.ensembl.org and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) and used to design specific primers for TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1, POT1, DKC1, TERT or IL-1 β and TNF- α using a freely available software from Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com). PCR reactions were performed in triplicate in a final volume of 20 μL . We used 3 μL of cDNA (1:20) as a template for qPCR reactions and SYBR green as the fluorescent detector. Primers' sequence, concentration, and specific running conditions are depicted in Supplementary Table 1. Thermal cycling profile for gene expression consisted of an initial denaturation step at 94°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 94°C , 15 s at specified annealing temperature (Supplementary Table 1) and 15 s at 72°C for data acquisition. Sole product amplification and absence of primer-dimer was confirmed using melting curve analysis at the end of each run. Additionally, we confirmed the amplification of a unique amplicon of the specified size

by agarose gel electrophoresis. Samples were normalized using the housekeeping gene *GNB2L1* as suggested by GeNorm (<https://genorm.cmgg.be/>) analysis and calibrated by the average of the ΔC_T of the group. In order to analyze data by the $\Delta\Delta C_T$ method [23], we previously confirmed similar PCR efficiencies between all studied targets (*TRF1*, *TRF2*, *RAP1*, *TPP1*, *POT1*, *DKC1*, *TERT*, *IL-1 β* and *TNF- α*) and endogenous control (*GNB2L1*).

2.6. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation levels in plasma samples were assessed by the non-enzymatic formation of eicosanoid levels in response to phospholipid oxidation using an 8-isoprostane (8-iso-P) competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cayman Chemical, USA) according to the manufacturer's instructions. Lipid peroxidation was measured at 370 nm by spectrophotometry using a SpectraMax® i3 plate reader (Molecular Devices).

2.7. Protein carbonyl content

Protein carbonyl content was quantified as previously described [24]. To sum up, plasma samples were treated with 10 mM dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 M HCl for 1 h at room temperature and then precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA). The subsequent protein pellet was washed 3 x with 1:1 ethanol/ethyl acetate mixture. Proteins were solubilized in 8 M urea and centrifuged at $16,000 \times g$ for 4 min to remove any trace of insoluble material. The carbonyl content was measured at 370 nm by spectrophotometry using a SpectraMax® i3 plate reader (Molecular Devices, USA).

2.8. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and Total antioxidant reactivity (TAR)

Total reactive antioxidant potential (TRAP) is an *in vitro* non-enzymatic method based on the action of total antioxidants on the luminescence decay of luminol-enhanced chemiluminescence generated by the reaction of luminol with a reliable and quantifiable source of alkyl peroxy radical derived from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). The thermal decomposition of these compounds in the presence of luminol produces luminescence, which is quenched by the addition of peroxy radical scavengers [25,26]. Plasma samples were added to the reaction and the luminescence produced by the free radical reaction was quantified every 5 s using a MicroBeta TriLux 1450 liquid scintillation counter (Perkin–Elmer, USA) until the readings were stabilized. Raw data were analyzed as 1 - area under the curve (1 - AUC).

The Total Antioxidant Reactivity (TAR) was obtained from the same experiment. The TAR results were calculated as the ratio of light intensity in the absence of samples/first light intensity reading after sample addition (I_0/I_1).

2.9. Sulfhydryl groups (-SH)

Total sulfhydryl groups were measured as previously described [27]. The assay provides a colorimetric readout of total reduced thiol content of a sample, based on the capacity of thiols groups to chemically reduce 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman's Reagent), which possesses a reactive disulfide bond susceptible to reduction. The reduction occurs by an exchange reaction in which a mixed disulfide and a yellow-colored 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) is formed. The intensity of the yellow color (indicating reduced thiol content) was measured at 412 nm by spectrophotometry using a SpectraMax® i3 plate reader (Molecular Devices).

2.10. Reduced glutathione (GSH) content

This method is based on the reaction of GSH with ortho-phthalaldehyde (OPA) [28]. Briefly, plasma samples were incubated with 1:1 metaphosphoric acid (MPA) in order to be deproteinized. Samples were maintained in the dark for 15 min after an addition of OPA (1 mg/mL, Sigma-Aldrich). The fluorescence was measured by excitation at 350 nm and emission at 420 nm by spectrophotometry using a SpectraMax® i3 plate reader (Molecular Devices). The results were quantified based on a GSH standard curve.

2.11. Data imputation

Missing data from each experimental procedure was imputed using the fully conditional specification approach, also known as multivariate imputation by chained equations, by supplying all other experimental data as well as demographic information. In brief, the algorithm imputes an incomplete column (the target column) by generating 'plausible' synthetic values given other columns in the data. Each incomplete column must act as a target column and has its own specific set of predictors. The default set of predictors for a given target consists of all other columns in the data. For predictors that are incomplete themselves, the most recently generated imputations are used to complete the predictors prior to the imputation of the target column. The imputation procedure was implemented using the mice package in the R statistical environment [29,30]. The mice function was employed using predictive mean matching method (PMM), 50 multiple imputations ($m = 50$), 10 iterations ($\text{maxit} = 10$) and seed = 123. The mean of the 50 computed imputations was considered the final values (expressed as black dots in the plots).

2.12. Principal component analysis (PCA)

Imputed experimental data from all procedures, except TRAP, was Box-Cox transformed. The arcsine square root transformation was employed for TRAP imputed values. After transformation, PCA computation and visualization was implemented using FactoMineR and factoextra packages in the R statistical environment [30–32].

2.13. Flow cytometry

Ex vivo protein expression of TRF1 was analyzed by flow cytometry. PBMC (1×10^6 cells) were stained with anti-TRF1 antibody conjugated with Alexa Fluor-647 (1:30, clone G-7, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) incubated for 30 min at 4 °C in the dark with the transcription factor kit (BD Pharmingen™, USA) following manufacturer's instructions. Samples (10,000 events) were acquired in the Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) and analyzed in the monocyte or lymphocyte gates with the Accuri C6 software. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI).

2.14. Statistical analyses

Categorical data are presented by absolute and relative frequency and continuous variables, using median and interquartile range, according to the asymmetry of the variables. Shapiro-Wilk test was performed to verify the normal distribution of samples for each variable. The comparison between groups was evaluated by unpaired *t*-test or Mann-Whitney test, depending on normal vs. non-normal distributed sample, respectively. To obtain data with a possible relationship between TL and age of the subjects, and among all observed variables, Spearman non-parametric correlation tests were performed. GraphPad Software Inc. version 6.01 (La Jolla, California, USA) and Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (SPSS v.22 for Windows, IBM Corp. Armonk, New York, USA) were used in all analyses. All tests were bidirectional and the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Table 1
Baseline and demographic characteristics.

	Groups		p value
	Control (n = 27)	Obese (n = 39)	
Gender (male), n/total (%)	11/27 (40.7)	9/39 (23.1)	0.1742
Age (years), median (IQR)	28.0 (26.0–33.0)	36.0 (32.7–41.2)	0.0006
BMI, median (IQR)	22.1 (20.7–23.2)	45.0 (41.4–50.2)	< 0.0001
Physical activity, n/total (%)	2/27 (7.4)	0/39 (0)	0.1636
Comorbidities, n/total (%)			
Dyslipidemia	0/27 (0)	24/39 (61.5)	–
Hepatic steatosis	0/27 (0)	19/39 (48.7)	–
Hypertension	0/27 (0)	21/39 (53.8)	–
Metabolic syndrome	0/27 (0)	21/39 (53.8)	–
Type 2 diabetes mellitus	0/27 (0)	11/39 (28.2)	–

IQR = Interquartile range.

Results are shown with number (percent) or median IQR (25–75%).

Bolded results indicate significant differences between groups (95% confidence interval).

(*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) or $p < 0.0001$ (****).

3. Results

3.1. Baseline and demographic characteristics

Subjects with obesity (n = 39) were older than subjects in the control (n = 27) group ($p < 0.0006$) and had more comorbidities ($p < 0.0001$). No differences regarding gender and physical activities were observed (Table 1).

3.2. Shorter telomere length in patients with obesity

Because age was different between groups ($p < 0.0006$) and telomeres naturally shorten with age, we compared TL after adjustment for age. Individuals with obesity had significantly shorter telomeres when compared to healthy controls ($p = 0.026$) (Fig. 1A). Because telomeres

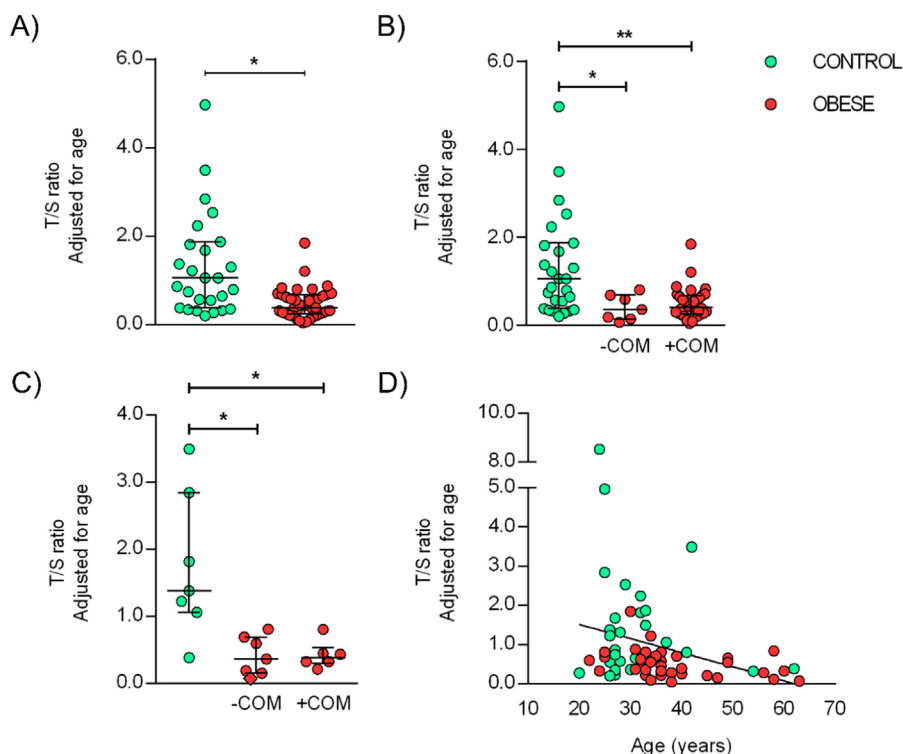


Fig. 1. Shorter telomeres among individuals with obesity. A) Individuals with obesity (n = 39) had shorter telomeres (T/S ratio) compared to healthy controls (n = 27) ($p = 0.026$) after adjustment for age. Differences were analyzed with Mann-Whitney *U*-test. B) Subgroup analysis of control individuals (n = 27), individuals without (n = 7) and with comorbidities (n = 32) from the obesity group show shorter telomeres' length (T/S) compared to healthy controls ($p = 0.01$ and $p = 0.05$, respectively) after adjustment for age. Differences were analyzed with Kruskal-Wallis test and Dunn's post-hoc comparisons. C) Subgroup analysis, paired for age and sex, among controls (n = 7) and individuals with obesity without (-COM, n = 7) or with comorbidities (+COM, n = 6) show shorter telomere length (T/S) compared to healthy controls ($p = 0.05$ and $p = 0.05$, respectively). Differences were analyzed with Kruskal-Wallis test and Dunn's post-hoc comparisons. D) Inverse association between age and telomere length in the group with obesity (Spearman correlation $r = -0.317$; $p = 0.0025$). Data are presented as median and IQR (25–75%). Significant differences considered when $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**). Abbreviations: n: sample size; IQR: Interquartile range.

attrition could also be explained by the presence of comorbidities, we did a subgroup analysis. We divided the group of patients with obesity (n = 39) according to the absence (n = 7) or presence of comorbidities (n = 32). Kruskal-Wallis analysis showed differences in the T/S ratio among the groups ($p = 0.0008$). Post-hoc Dunns' multiple comparisons test revealed that obese patients without ($p = 0.05$) and with comorbidities ($p = 0.01$) were different from controls (Fig. 1B). When we matched eutrophic individuals (n = 7), and obese patients without (n = 7) or with comorbidities (n = 6) for age [median (IQR); 32.0 (26.0–42.0), 33.0 (25.0–47.0) and 34.5 (30.0–48.8) years], and for sex (male/n; 2/7; 2/7; 2/6), we observed comparable results shown in Fig. 1C. In this regard, we can conclude that the differences in the T/S ratio are related to the obesity condition by itself and not related to different comorbidity disturbances. As expected, we detected an inverse association between age and telomere length in the group of patients with obesity ($r = -0.317$, $p = 0.0025$) (Fig. 1D).

3.3. Upregulated gene expression of shelterin components, DKC1 and an inflammatory profile in patients with obesity

In this work, we included 66 subjects. Because there were missing data for some of the analyzed variables, we performed data imputation. Results from imputed (n = 66) and non-imputed incomplete data sets (n < 66) did not differ and maintained the same significance (Supplementary Table 2). Our results from imputed data showed increased mRNA levels for *TRF1* ($p = 0.0216$), *TRF2* ($p = 0.0145$), *RAP1* ($p = 0.003$), *POT1* ($p = 0.0315$) and the accessory protein *DKC1* ($p = 0.0244$) in PBMC from subjects with obesity. Shelterin component *TPP1* showed no difference ($p = 0.9665$) (Fig. 2). Irrespective of the group, gene expression of the telomerase catalytic subunit (*TERT*) was not detected in most of the samples (data not shown).

As expected, gene expression from *IL-1 β* [detected in few controls (12/27) and in few obese patients (14/39); 0.035 (0.02–0.07) vs 56.92 (8.05–99.61), $p < 0.0001$] and *TNF- α* [detected in few controls (3/27) and in few obese patients (8/39); 0.48 (0.05–0.81) vs 1.65 (0.69–4.24), $p = 0.097$], were upregulated in patients with obesity (data not shown).

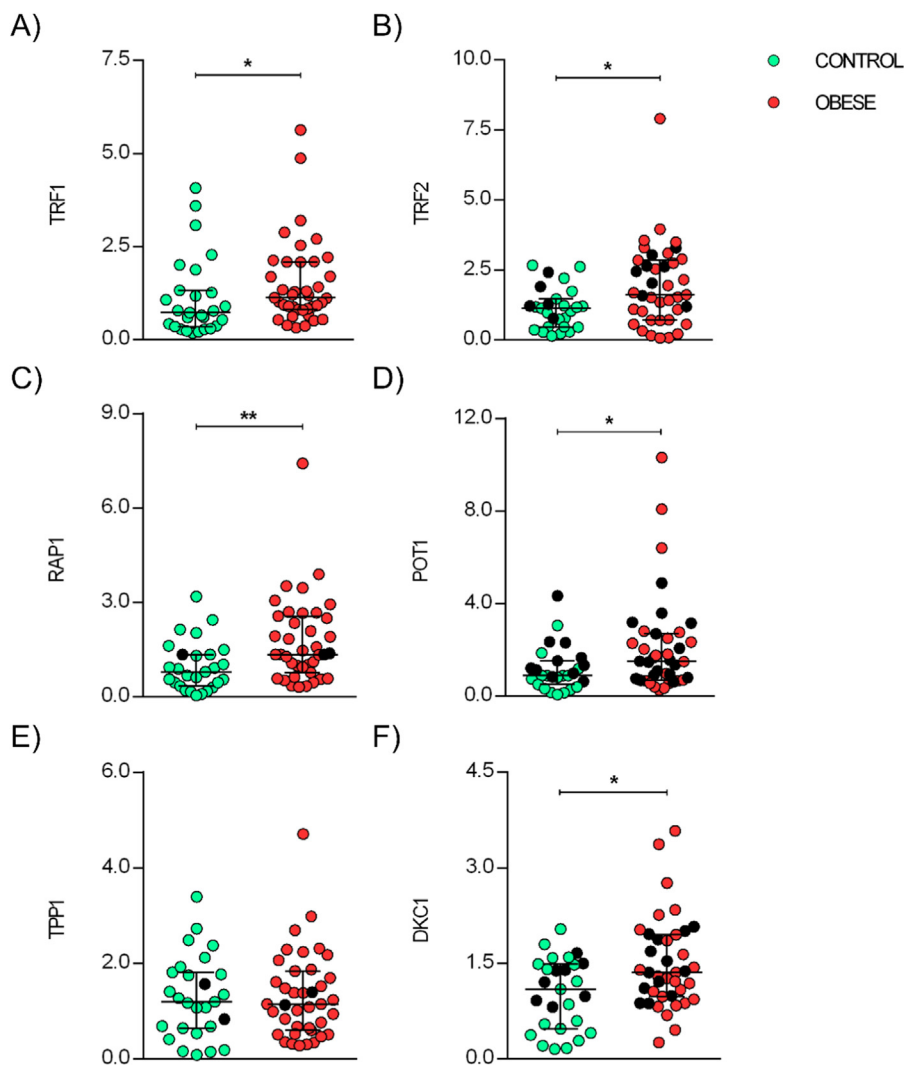


Fig. 2. Individuals with obesity showed increased gene expression levels of shelterin components. Relative gene expression of shelterin components was analyzed in PBMC from controls ($n = 27$) or individuals with obesity ($n = 39$). Samples were analyzed by the comparative method ($\Delta\Delta cT$) and normalized to *GNB2L1*. A) *TRF1*, B) *TRF2*, C) *RAP1*, D) *POT1*, and F) the accessory protein *DKC1*. Shelterin component E) *TPP1* showed no difference between groups. Data are presented as median and IQR (25–75%). Differences were analyzed with Mann-Whitney *U*-test. Significant differences considered when $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). Abbreviations: n: sample size; IQR: Interquartile range; TRF1: Telomeric repeat binding factor; TRF2: Telomeric repeat binding factor 2; RAP1: Repressor/activator protein 1; TPP1: Adrenocortical dysplasia protein homolog; POT1: Protection of telomeres protein 1; DKC1: Dyskerin; TERT: Catalytic subunit of the telomerase holoenzyme complex; GNB2L1: Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1.

3.4. Augmented macromolecules' damage in patients with obesity

Patients with obesity showed increased lipid peroxidation levels, reflected as a higher amount of 8-iso-P ($p = 0.0027$) (Fig. 3A). We also found significantly higher oxidized protein levels ($p = 0.0074$) by carbonyl content measurement (Fig. 3B). These results indicate an increased damage caused by oxidative imbalance observed in plasma from patients with obesity.

3.5. Augmented non-enzymatic antioxidant defenses in obese patients

Subjects with obesity also showed total non-enzymatic antioxidant capacity (TRAP) and reactivity (TAR) significantly higher than healthy controls ($p < 0.0001$) (Fig. 3C and D), as well as higher levels of total reduced sulfhydryl groups ($p = 0.0451$) (Fig. 3E), with no difference in GSH content ($p = 0.4127$) (Fig. 3F).

3.6. TRF1 is the main factor contributing to the variance between groups

To explore additional associations, we investigated correlations among all observed variables and whether telomere shortening was correlated to any studied factor. The results demonstrated positive associations between TRF1 and many observed variables (Fig. 4). Interestingly, the T/S ratio was only inversely correlated with TRAP (non-significant correlations are depicted in Supplementary Figure 1).

Since many factors can influence telomeres' length, we performed a

principal component analysis (PCA) to analyze the contribution of these analyzed factors into the shortening of telomeres as our outcome. Our analysis showed that 36.6% of the sample variance can be explained by the first principal component (PC1) (Fig. 5A), and the first two principal components (PC1 + PC2) contain 52.3% of the variance information between groups, as depicted by the plots that defined two clusters of data (Fig. 5B). In addition, the PCA allowed us to simplify the analysis and discover a hierarchical order for telomere shortening contribution to each PC. In this case, TRF1, POT1, RAP1, TPP1, and DKC1 were revealed as variables that mostly contributed to PC1 variance (Fig. 5D).

Because TRF1 appeared as a major contributor for telomere shortening, TRF1 protein expression was validated by flow cytometry in samples from newly recruited participants (Fig. 6A and B). Similar to *TRF1* gene expression (Fig. 2A), protein levels of TRF1 were higher in the group of patients with obesity ($n = 10$) when compared to age and sex-matched controls ($n = 8$) ($p = 0.0002$). Demographic data from this new cohort is depicted in Supplementary Table 3.

4. Discussion

Obesity is characterized as an energy imbalance-related disorder where adipose tissue expansion is central for metabolic impairment. Obesity leads to an increased risk of morbidity and reduced life expectancy [33,34]. Metabolic dysfunctions associated with obesity, such as dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, high LDL levels, and DM2, contribute to a pro-inflammatory and pro-oxidative imbalance

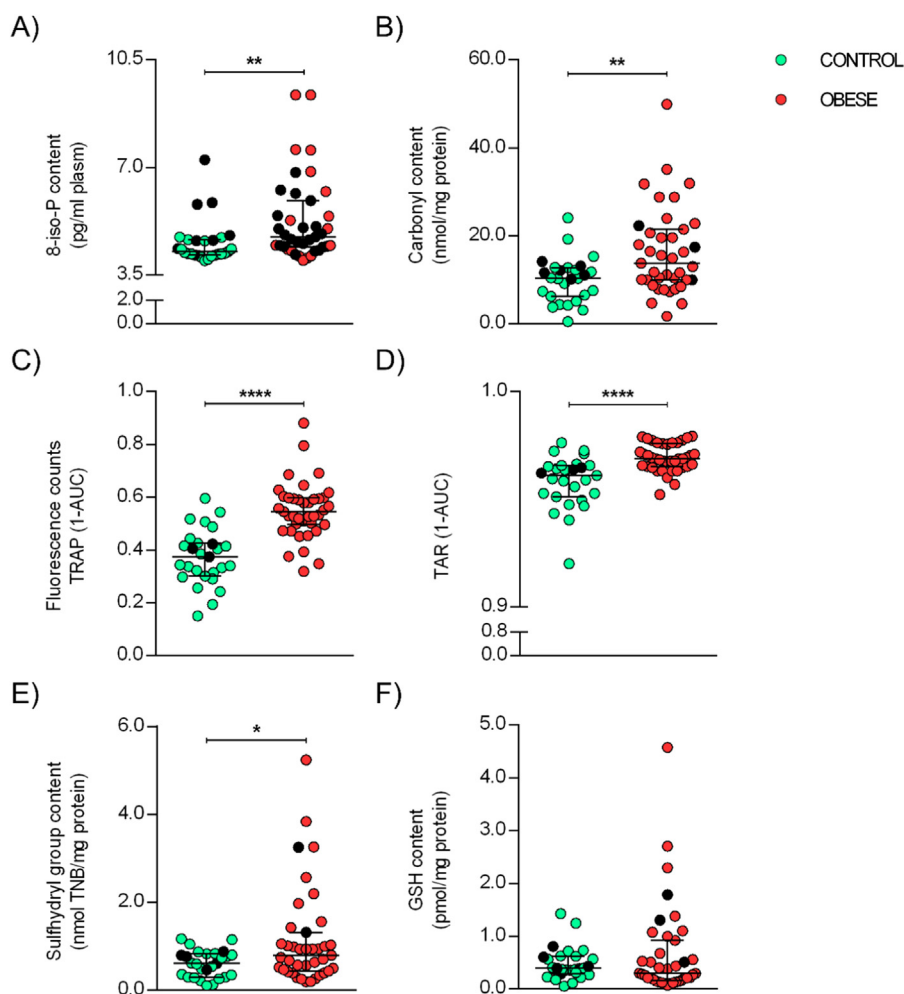


Fig. 3. Increased macromolecules' damage in plasma from subjects with obesity. Plasma from patients with obesity showed, A) increased levels of lipid peroxidation ($p = 0.0027$) and B) higher oxidized protein levels ($p = 0.0074$). C) TRAP and D) TAR were both higher in patients with obesity ($p > 0.0001$), as well as E) total sulfhydryl groups ($p = 0.0451$). F) There was no difference in GSH content ($p = 0.4127$). Data are presented as a median and IQR (25–75%). Black dots represent imputed data. Differences were analyzed with Mann-Whitney *U*-test. Green dots represent individuals from the control group; red dots represent individuals with obesity and black dots represent imputed data. Significant differences considered when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.0001$ (****). Abbreviations: IQR: Interquartile range; TRAP: Total Reactive Antioxidant Potential; TAR: Total Antioxidant Reactivity; GSH: Reduced Glutathione.

environment [35]. Increased ROS levels play a crucial role in the metabolic syndrome onset, mostly triggering insulin resistance and dysregulating glucose homeostasis [36]. Even more interesting is the observation that all the above-mentioned obesity-related comorbidities are also associated with shortened telomeres [37–39].

From our study, three important conclusions can be drawn. First, our results demonstrate that adults with severe or morbid obesity show reduced telomeres' length in comparison with eutrophic subjects. Second, it evidences that the condition of obesity alters telomeres' homeostasis through the shelterin components, mainly TRF1, and finally, indicates that the antioxidant adaptive responses are not

sufficient to counteract the oxidative stress and telomeres attrition.

One hypothesis about aging is that immediate telomeres' shortening occurs early in many diseases, suggesting that telomere length may be an important biological marker for the early development of pathologies [40]. Indeed, dysregulated telomere length has been implicated and causally related to hematological diseases, such as aplastic anemia, dyskeratosis congenita and idiopathic pulmonary fibrosis [41–43] and also different types of cancers [44,45]. However, in the context of obesity, the nature of the association with shorter TL is still under debate. Obese children are at higher risk for the persistence of obesity and development of other comorbidities in adulthood [46]. Buxton et al.

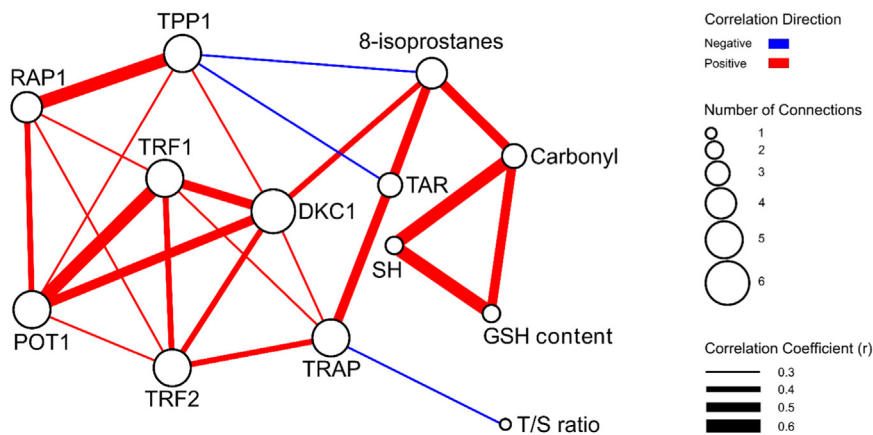


Fig. 4. Plot depicting gene interactions between significantly different ($p < 0.05$) variables. The number of interactions within one variable is represented by the size of the node (circle), and the magnitude (line thickness) and color (blue or red) of the connector represent the regression coefficient (based on r values) and direction ($r > 0$ or $r < 0$), respectively. The absence of significant correlation (r) and significance ($p > 0.05$) between variables is not represented. Abbreviations: TRF1: Telomeric repeat binding factor 1; TRF2: Telomeric repeat binding factor 2; RAP1: Repressor/activator protein 1; TPP1: Adrenocortical dysplasia protein homolog; POT1: Protection of telomeres protein 1; DKC1: Dyskerin; TRAP: Total Reactive Antioxidant Potential; TAR: Total Antioxidant Reactivity; GSH: Reduced Glutathione.

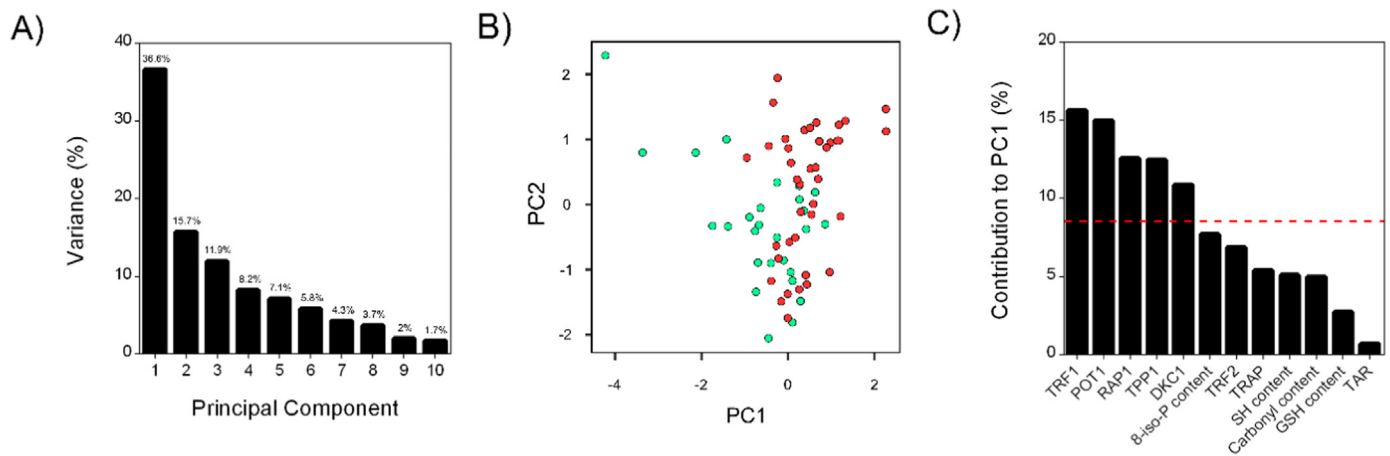


Fig. 5. TRF1 as a major contributor for clustering among the groups. Principal component analysis (PCA) showed that A) 36.6% of the sample variance can be explained by the first principal component (PC1), and B) the first two principal components (PC1 + PC2) contain 52.3% of the variance information between groups. C) Bar plot showing TRF1 as a variable that mostly contributed to PC1. The red dashed line indicates the expected average contribution (1/12 studied variables = 8,33%) of each variable. Abbreviations: TRF1: Telomeric repeat binding factor; TRF2: Telomeric repeat binding factor 2; RAP1: Repressor/activator protein 1; TPP1: Adrenocortical dysplasia protein homolog; POT1: Protection of telomeres protein 1; DKC1: Dyskerin; TRAP: Total Reactive Antioxidant Potential; TAR: Total Antioxidant Reactivity; GSH: Reduced Glutathione.

demonstrated that the impact caused by accelerated shortening of telomeres due to obesity might begin as early as childhood. Their results evidence a strong association between short leukocyte telomeres and the occurrence of obesity for both genders [47]. To our knowledge, there is only one study in adults suggesting that shorter telomeres in leukocytes may be a risk factor for increased adiposity possibly accelerating the aging process in the context of obesity [48].

Our results showing shorter TL in patients with obesity after age-adjustment are in accordance with a previous meta-analysis published by our group where we evaluated 63 original studies comprising 119,439 subjects. Although heterogeneity was high among the studies, in this analysis we observed a weak and moderate negative correlation between obesity and TL, suggesting that additional studies are still on demand [18]. Telomeres' attrition doesn't always correlate with aging in all studied groups from humans, especially in the elderly; suggesting that the argument of telomeres length as a biomarker of aging is still under debate [49,50].

Also, many confounding variables such as gender and comorbidities might influence TL and male gender is associated with shorter telomeres [51]. For example, in our first cohort (Table 1), the number of men in each group was different (40.7% and 23.1% in the control and obese group, respectively), and analyses were not adjusted for sex. However, the higher percentage of males is in the control group, suggesting that, if present, the effect of sex on the T/S ratio would bias the TL in the opposite direction: diminishing the T/S in the control group. In addition, the absence of comorbidities in the control group could be

misinterpreted and super estimate the differences found in the TL from the obese group; shorter TL could be interpreted as due to the obesity condition either by itself or to the different comorbidities disturbances. Indeed, subgroup analysis, separating patients with obesity according to the absence or presence of comorbidities demonstrated differences in the T/S ratio among the groups (control *versus* obese) and no differences between obese patients without and with comorbidities. We observed comparable results when groups were paired for age and sex without and with comorbidities. In this regard, we can conclude that the observed differences in the T/S ratio are related to the obesity condition by itself and not related to different comorbidities disturbances. In line with these findings, longitudinal studies are focusing on biological mechanisms that elucidate the relationship between accelerated telomere shortening and obesity. Formichi et al. monitored 93 individuals with severe obesity after bariatric surgery and observed reduced TL in obese patients when compared to healthy individuals with no effect after 12 months of surgery [52]. Contrary, Laimer et al. observed a recovery and increase in TL post-bariatric surgery after 10 years of accompaniment [53]. Their results may indicate that telomere length restoration may be achieved by pronounced and sustained weight loss over a longer period of intervention but no mention of the possible mechanism of action was addressed.

Telomere length can be controlled at distinct levels. Cross-talk between the enzyme telomerase and the shelterin proteins is necessary to preserve telomeres homeostasis [54]. In our settings, we did not observe gene expression of the catalytically active component of the

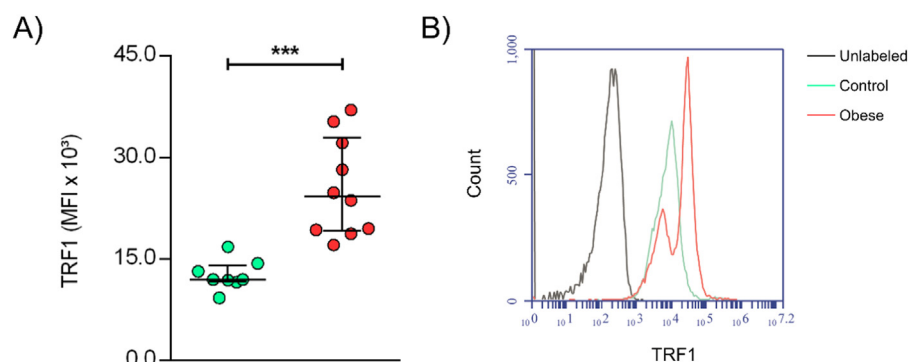


Fig. 6. Augmented TRF1 protein expression. A) TRF1 analysis showed an overexpression in PBMC of obese patients (red dots, n = 10) compared to controls (green dots, n = 8) ($p = 0.0002$). B) Representative histograms of TRF1 protein expression. Abbreviations: MFI: median fluorescence intensity.

telomerase enzyme (*TERT*) in PBMC. This result is expected, as circulating peripheral leukocytes are not proliferating cells and telomerase has low activity in T and B cells but not in monocytes [55]. On the other side, in this study, we observed an up-regulation of *IL-1 β* gene expression in PBMC from subjects with obesity, a cytokine also synthesized by adipocytes and resident and infiltrated macrophages that might contribute to the establishment of a local and systemic inflammation environment during the expansion of the adipose tissue [56,57]. Thus, this para-inflammation state present in obesity might induce an augmented rate of proliferation of hematopoietic precursors in the bone marrow and the expansion and proliferation of leukocytes in peripheral sites driving leukocyte senescence and telomeres shortening. In agreement with these findings, we have previously shown that plasma from patients with obesity is responsible for the induction of an immunosenescent phenotype in non-related donor healthy PBMC [58].

Shelterin proteins are main regulators of telomere length metabolism. The tridimensional structure of the T and D-loop is responsible for protecting chromosomes ends from degradation, repair activities and in active-telomerase cells, of its action [12]. In the context of obesity, our study reveals gene expression up-regulation of *TRF1*, *TRF2*, *POT1* and *RAP1* transcripts in PBMC. *TRF1*, *TRF2*, and *POT1* have all been described as cis-negative regulators for TL [59], although they perform different functions in telomeres' maintenance during homeostasis. We measured different variables, as gene expression from the shelterin complex, parameters of the redox system, parameters of inflammation and telomeres shortening. Because the aim of our work was to identify, which of the variables, in the context of the obesity, best explain and reflect the dynamics of our system: the observation of shortened telomeres, we performed a PCA. PCA was used as a statistical tool to systematically extract from all that measurements, the variable/variables that best reflected the dynamics of telomeres attrition [60], and the results identified *TRF1* as a major negative regulator of telomeres' attrition in the context of obesity. To our knowledge, we are first to demonstrate up-regulation of *TRF1* in PBMC from patients with obesity, a condition that is associated with a higher incidence of cancer [61–63]. *TRF1* depletion has been associated with chromosome breakage [64] and protection but not elongation of the telomeres [65]. In contrast with these findings, we have additional data from our cohort of patients with obesity showing a higher frequency of micronucleus and karyolysis in oral mucosal epithelial cells (Parisi et al., manuscript under preparation), conditions also associated with a higher predisposition for the augmented incidence of cancer observed in the context of obesity. Although our study design did not allow us to demonstrate causal relationships but associations, our data suggest that an initial genetic damage already established is present in the context of obesity and might be interpreted as signaling for future transformation.

Similar to *TRF1* and *TRF2*, recent data suggest that *POT1* would initially inhibit the translocation of the enzyme telomerase to the telomeres and prevent its interaction with the telomeres, therefore elongation [66]. In addition, *POT1*'s promoter has an element recognition site for the binding of NF- κ B suggesting another link with inflammation. Indeed, in a macrophages lineage, *POT1* action has been observed in extranuclear locations in the cytosol, pointing to extra-telomeric functions associated with the inhibition of the endocytosis mechanism and reduction of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme [67]. In conclusion, these observations suggest that *POT1* up-regulation might act as a mechanism for telomeres elongation inhibition, a link with inflammation and impairment of the innate immune system, contributing to an augmented susceptibility towards bacterial infections, as already documented in the context of obesity. Our results on PCA also revealed *POT1* up-regulation as an important factor, resembling to *TRF1* and contributing to telomere shortening in the context of obesity. Indeed, *POT1* is related to repress DDR by the serine/threonine kinases ataxia telangiectasia-mutated Rad3-related (ATR) - mediated pathway [68], protecting telomeric DNA from genetic abnormalities. These findings could possibly be related to an attempt to prevent the

activation of DNA damage response related to dysfunctional telomeres.

TRF1 and *TRF2* forms a bridge with *TIN2* and connects with ssDNA through *POT1* [69]. Knock out mice confirm the role of *TRF2* in the assembly of the T-loop. Its overexpression is associated with augmented T-loop formation, inversely correlated with telomerase activity [70] and functions avoiding end-to-end fusions [71,72]. The presence of a single strand non-protected or uncapped DNA is a trigger for the DDR signaling and induction of senescence or apoptosis. Because *TRF2* physically interacts with enzymes from the nucleotide excision repair [73], its upregulation is also associated with chromosomal instability, suggesting again an augmented risk factor for the development of cancer, as shown in prostate cancer [61].

In this report, we showed augmented *RAP1* expression in the context of obesity. This result was at least surprisingly, as previous works done in mice suggest a protective role for *RAP1* against obesity and metabolic dysfunction [74–76]. However, *RAP1* is associated in the shelterin complex through the interaction with *TRF2* and does not have regulatory functions for telomere length [77]. Additional non-telomeric cytoplasmic functions have been described for mammalian *RAP1* through interaction with the inhibitor kappa B kinases (IKK) in the cytoplasm and the modulation of nuclear factor kappa B (NF- κ B)-mediated pathways. A regulatory feedback has been ascribed for *RAP1* where augmented levels are positively regulated by NF- κ B, and human breast cancers with NF- κ B hyperactivity show elevated levels of cytoplasmic *RAP1* [78]. In agreement with these findings, breast carcinoma cell lines treated with tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) have shown a 5 or 6-fold induction of *TRF1*, *TIN2*, and *POT1*. The pro-inflammatory milieu further suggests a link between shelterin proteins and inflammation.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are ligand-activated transcription factors that belong to the superfamily of nuclear hormone receptors and play a key role in various processes including modulation of differentiation and cell viability, biomolecules metabolism, and inflammation. However, the activities promoted by PPAR depends on the cell type and the binding isoform, to favor different cell processes in distinct outcomes [79,80]. Martinez et al. demonstrated that *RAP1* knockout mouse embryonic fibroblasts (MEF) have down-regulation of PGC-1 α [81] and PPAR α , showing the premature development of obesity and associated comorbidities [74]. Furthermore, macrophages induce PGC-1 α [82]. In this way up-regulation of *RAP1* gene expression, as observed in this work, could be involved in the regulation of the PPAR pathway.

Telomere shortening contributes to metabolic dysfunction through the impact on mitochondrial biogenesis and metabolism in a rodent model [83]. Metabolic dysfunctions such as those seen in obesity have an important role in accelerated aging development even in the absence of any other source [84]. Studies demonstrate that damage caused by ROS accumulation is related to physiological aging in both human [85,86] and rodent [87] models, although the mechanisms by which oxidative imbalance can accelerate aging is still under debate. In normal physiological functions, redox homeostasis allows maintenance of a reduced intracellular environment by ensuring properly protein structure and function and lower peroxidation levels [88]. However, an impairment of redox status promote an oxidative imbalance by an accumulation and dysregulated ROS signaling that may lead to anomalous cell dysfunction, contributing to disease progression [89]. Thus, excessive oxidative stress appears to be an important feature in numerous aging-related diseases since there is an increased level of ROS production that cannot be totally scavenged by antioxidants defenses [90].

In this regard, we also demonstrate that subjects with obesity have a plasmatic pro-oxidant environment observed by a higher protein oxidation and lipid peroxidation levels. Our results also indicate that this impairment caused by an oxidative imbalance leads to increased non-enzymatic antioxidant defenses, which appears to be an adaptive rescue response to avoid cellular dysfunction by an excessive damage caused by enhanced ROS levels.

Biomolecule damage caused by ROS in obesity is widely described in the literature. Several studies show an elevated protein carbonylation amount, both in adipose tissue [91] and plasma, with a strong association with diabetes mellitus [92]. Besides this, higher plasmatic lipid peroxidation levels are also detected [93]. Our results on antioxidant capacity are in agreement with a recent study that evaluated DM2 patients in relation to healthy controls, in which the authors showed an increased total antioxidant status in plasma samples [94]. Non-enzymatic antioxidants, composed by ascorbic acid (Vitamin C), α -tocopherol (Vitamin E), polyphenols (flavonoids and phenolic acids), carotenoids, GSH, and others, represents the major defenses in plasma [95]. However, because of sample limitation, we were unable to analyze further enzymatic antioxidant defenses such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase.

In summary, our study adds valuable information to current literature and shows that PBMC telomeres' homeostasis is compromised, favoring shorter telomeres, in the context of severe and morbid obesity. Additionally, our study identifies TRF1 as a major regulator of telomeres attrition in the context of obesity. We suggest that telomeres uncapping by shelterin components might be partially explained by TRF1 upregulation, a mechanism that might accelerate the aging process associated with augmented damage of proteins and lipids and the pro-oxidant environment and might predispose cells for neoplastic transformation. The increased non-enzymatic antioxidant defenses observed in the plasma may be a cellular oxidative imbalance adaptive rescue response to evade dysfunctional signaling and cell death.

Acknowledgments

The authors want to thank the invaluable support from Rejane von Muhlen with sample patient recruitment. This research was supported by Brazilian Research Agencies - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). FMB-T received a scholarship from CAPES.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.039](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.039)

References

- [1] W.H. Organization, Obesity and overweight factsheet from the WHO, Health (2017).
- [2] R.S. Ahima, Connecting obesity, aging and diabetes, *Nat. Med.* 15 (9) (2009) 996–997.
- [3] C. Lopez-Otin, M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell* 153 (6) (2013) 1194–1217.
- [4] G. Paradies, G. Petrosillo, V. Paradies, F.M. Ruggiero, Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (10) (2010) 1286–1295.
- [5] C.H. Wang, S.B. Wu, Y.T. Wu, Y.H. Wei, Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging, *Exp. Biol. Med.* 238 (5) (2013) 450–460.
- [6] F.M. Sohet, A.M. Neyrinck, B.D. Pachikian, F.C. de Backer, L.B. Bindels, P. Niklowitz, T. Menke, P.D. Cani, N.M. Delzenne, Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice, *Biochem. Pharmacol.* 78 (11) (2009) 1391–1400.
- [7] D. Harman, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.* 11 (3) (1956) 298–300.
- [8] E.H. Blackburn, Structure and function of telomeres, *Nature* 350 (6319) (1991) 569–573.
- [9] W. Palm, T. de Lange, How shelterin protects mammalian telomeres, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 301–334.
- [10] M.A. Shammass, Telomeres, lifestyle, cancer, and aging, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14 (1) (2011) 28–34.

- [11] M. Lisby, T. Teixeira, E. Gilson, V. Geli, The fate of irreparable DNA double-strand breaks and eroded telomeres at the nuclear periphery, *Nucleus* 1 (2) (2010) 158–161.
- [12] J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell* 97 (4) (1999) 503–514.
- [13] Y. Doksani, J.Y. Wu, T. de Lange, X. Zhuang, Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation, *Cell* 155 (2) (2013) 345–356.
- [14] J.D. Watson, Origin of concatemeric T7 DNA, *Nat.: New Biol.* 239 (94) (1972) 197–201.
- [15] S. Bekaert, T. De Meyer, P. Van Oostveldt, Telomere attrition as ageing biomarker, *Anticancer Res.* 25 (4) (2005) 3011–3021.
- [16] A.M. Valdes, T. Andrew, J.P. Gardner, M. Kimura, E. Oelsner, L.F. Cherkas, A. Aviv, T.D. Spector, Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women, *Lancet* 366 (9486) (2005) 662–664.
- [17] T. De Meyer, E.R. Rietzschel, M.L. De Buyzere, W. Van Criekinge, S. Bekaert, Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends? *Ageing Res. Rev.* 10 (2) (2011) 297–303.
- [18] E. Mundstock, E.E. Sarria, H. Zatti, F. Mattos Louzada, L. Kich Grun, M. Herbert Jones, F.T. Guma, J. Mazzola In Memoriam, M. Epifanio, R.T. Stein, F.M. Barbe-Tuana, R. Mattiello, Effect of obesity on telomere length: systematic review and meta-analysis, *Obesity* 23 (11) (2015) 2165–2174.
- [19] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1) (1987) 156–159.
- [20] F.M. Barbe-Tuana, M.M. Parisi, B.S. Panizzutti, G.R. Fries, L.K. Grun, F.T. Guma, F. Kapczynski, M. Berk, C.S. Gama, A.R. Rosa, Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease, *Rev. Bras. De. Psiquiatr.* 38 (4) (2016) 281–286.
- [21] L.S. Czepielewski, R. Massuda, B. Panizzutti, E.D. da Rosa, D. de Lucena, D. Macedo, L.K. Grun, F.M. Barbe-Tuana, C.S. Gama, Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: evidence of accelerated aging, *Schizophr. Res.* 174 (1–3) (2016) 39–42.
- [22] R.M. Cawthon, Telomere measurement by quantitative PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (10) (2002) e47.
- [23] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- [24] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenzi, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [25] D.D. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke, Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins, *FEBS Lett.* 187 (1) (1985) 33–37.
- [26] M.T. Dresch, S.B. Rossato, V.D. Kappel, R. Biegelmeyer, M.L. Hoff, P. Mayorga, J.A. Zuanazzi, A.T. Henriques, J.C. Moreira, Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential, *Anal. Biochem.* 385 (1) (2009) 107–114.
- [27] J.R. Winther, C. Thorpe, Quantification of thiols and disulfides, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2) (2014) 838–846.
- [28] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol. Biol.* 108 (1998) 347–352.
- [29] S. Buuren, K. Groothuis-Oudshoorn, mice: multivariate imputation by chained equations in R, *J. Stat. Softw.* 45 (3) (2011).
- [30] R.C. Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing; 2014. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
- [31] S. Lê, J. Josse, F. Husson, FactoMineR: an R package for multivariate analysis, *J. Stat. Softw.* 25 (1) (2008) 1–18.
- [32] A. Kassambara, F. Mundt, Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses, R. Package Version 1 (3) (2016).
- [33] G. Murdolo, M. Piroddi, F. Luchetti, C. Tortoioli, B. Canonico, C. Zerbinati, F. Galli, L. Iuliano, Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance, *Biochimie* 95 (3) (2013) 585–594.
- [34] I. Savini, M.V. Catani, D. Evangelista, V. Gasperi, L. Avigliano, Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (5) (2013) 10497–10538.
- [35] L. Marsiglia, S. Manti, G. D'Angelo, A. Nicotera, E. Parisi, G. Di Rosa, E. Gitto, T. Arrigo, Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (1) (2014) 378–400.
- [36] N. Houstis, E.D. Rosen, E.S. Lander, Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, *Nature* 440 (7086) (2006) 944–948.
- [37] A. Aulinas, M.J. Ramirez, M.J. Barahona, E. Valassi, E. Resmini, E. Mato, A. Santos, I. Crespo, O. Bell, J. Surrallés, S.M. Webb, Dyslipidemia and chronic inflammation markers are correlated with telomere length shortening in Cushing's syndrome, *PLoS One* 10 (3) (2015) e0120185.
- [38] I. Strazhesko, O. Tkacheva, S. Boytsov, D. Akasheva, E. Dudinskaya, V. Vygodin, D. Skvortsov, P. Nilsson, Association of insulin resistance, arterial stiffness and telomere length in adults free of cardiovascular diseases, *PLoS One* 10 (8) (2015) e0136676.
- [39] A.R. Bonfigli, L. Spazzafumo, F. Prattichizzo, M. Bonafe, E. Mensa, L. Micolucci, A. Giuliani, P. Fabbietti, R. Testa, M. Boemi, F. Lattanzio, F. Olivieri, Leukocyte telomere length and mortality risk in patients with type 2 diabetes, *Oncotarget* 7 (32) (2016) 50835–50844.
- [40] H. Oeseburg, R.A. de Boer, W.H. van Gilst, P. van der Harst, Telomere biology in healthy aging and disease, *Pflug. Arch.: Eur. J. Physiol.* 459 (2) (2010) 259–268.
- [41] P. Scheinberg, J.N. Cooper, E.M. Sloand, C.O. Wu, R.T. Calado, N.S. Young,

- Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia, *JAMA* 304 (12) (2010) 1358–1364.
- [42] H. Tummala, A. Walne, L. Collopy, S. Cardoso, J. de la Fuente, S. Lawson, J. Powell, N. Cooper, A. Foster, S. Mohammed, V. Plagnol, T. Vulliamy, I. Dokal, Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita, *J. Clin. Invest.* 125 (5) (2015) 2151–2160.
- [43] M. Armanios, Telomerase mutations and the pulmonary fibrosis-bone marrow failure syndrome complex, *New Engl. J. Med.* 367 (4) (2012) 384 (author reply 384).
- [44] Y. Chen, Y. Wu, X. Huang, P. Qu, G. Li, T. Jin, J. Xing, S. He, Leukocyte telomere length: a novel biomarker to predict the prognosis of glioma patients, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (10) (2015) 1739–1747.
- [45] L.M. Hurwitz, C.M. Heaphy, C.E. Joshi, W.B. Isaacs, Y. Konishi, A.M. De Marzo, S.D. Isaacs, K.E. Wiley, E.A. Platz, A.K. Meeker, Telomere length as a risk factor for hereditary prostate cancer, *Prostate* 74 (4) (2014) 359–364.
- [46] R. Lakshman, C.E. Elks, K.K. Ong, Childhood obesity, *Circulation* 126 (14) (2012) 1770–1779.
- [47] J.L. Buxton, R.G. Walters, S. Visvikis-Siest, D. Meyre, P. Froguel, A.I. Blakemore, Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (5) (2011) 1500–1505.
- [48] O.T. Njajou, R.M. Cawthon, E.H. Blackburn, T.B. Harris, R. Li, J.L. Sanders, A.B. Newman, M. Nalls, S.R. Cummings, W.C. Hsueh, Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly, *Int. J. Obes.* 36 (9) (2012) 1176–1179.
- [49] K.A. Mather, A.F. Jorm, R.A. Parslow, H. Christensen, Is telomere length a biomarker of aging? A review, *J. Gerontol. Ser. A: Biomed. Sci. Med. Sci.* 66 (2) (2010) 202–213.
- [50] J.L. Sanders, A.B. Newman, Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol. Rev.* 35 (1) (2013) 112–131.
- [51] Y.-Y. Cheng, T.-W. Kao, Y.-W. Chang, C.-J. Wu, T.-C. Peng, L.-W. Wu, H.-F. Yang, F.-Y. Liaw, W.-L. Chen, Examining the gender difference in the association between metabolic syndrome and the mean leukocyte telomere length, *PLoS One* 12 (7) (2017) e0180687.
- [52] C. Formichi, S. Cantara, C. Ciuoli, O. Neri, F. Chiofalo, F. Selmi, A. Tirone, G. Colasanto, L. Di Cosmo, G. Vuolo, F. Pacini, Weight loss associated with bariatric surgery does not restore short telomere length of severe obese patients after 1 year, *Obes. Surg.* 24 (12) (2014) 2089–2093.
- [53] M. Laimer, A. Melmer, C. Lamina, J. Raschenberger, P. Adamovski, J. Engl, C. Ress, A. Tschoner, C. Gelsinger, L. Mair, S. Kiechl, J. Willeit, P. Willeit, C. Stettler, H. Tilg, F. Kronenberg, C. Ebenbichler, Telomere length increase after weight loss induced by bariatric surgery: results from a 10 year prospective study, *Int. J. Obes.* 40 (5) (2016) 773–778.
- [54] D. Hockemeyer, K. Collins, Control of telomerase action at human telomeres, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (11) (2015) 848–852.
- [55] N.P. Weng, Telomere and adaptive immunity, *Mech. Ageing Dev.* 129 (1–2) (2008) 60–66.
- [56] C. Lagathu, L. Yvan-Charvet, J.P. Bastard, M. Maachi, A. Quignard-Boulange, J. Capeau, M. Caron, Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes, *Diabetologia* 49 (9) (2006) 2162–2173.
- [57] H. Tilg, A.R. Moschen, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (10) (2006) 772–783.
- [58] M.M. Parisi, L.K. Grun, P. Lavandoski, L.B. Alves, I.J. Bristol, R. Mattiello, C.C. Mottin, F. Klamt, M.H. Jones, A.V. Padoin, F.C.R. Guma, F.M. Barbe-Tuana, Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation, *Obesity* 25 (9) (2017) 1523–1531.
- [59] B. van Steensel, T. de Lange, Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1, *Nature* 385 (6618) (1997) 740–743.
- [60] J. Shlens, A Tutorial on Principal Component Analysis, 2005, Institute for Nonlinear Science, UCSD, 2010.
- [61] W. Chen, Y. Wang, F. Li, W. Lin, Y. Liang, Z. Ma, Expression of telomere repeat binding factor 1 and TRF2 in prostate cancer and correlation with clinical parameters, *BioMed. Res. Int.* 2017 (2017) 9764752.
- [62] B.K. Oh, Y.J. Kim, C. Park, Y.N. Park, Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to telomere shortening during human multistep hepatocarcinogenesis, *Am. J. Pathol.* 166 (1) (2005) 73–80.
- [63] N. Matsutani, H. Yokozaki, E. Tahara, H. Tahara, H. Kuniyasu, K. Haruma, K. Chayama, W. Yasui, E. Tahara, Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas, *Int. J. Oncol.* 19 (3) (2001) 507–512.
- [64] A. Sfeir, S.T. Kosiyatrakul, D. Hockemeyer, S.L. MacRae, J. Karlseder, C.L. Schildkraut, T. de Lange, Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication, *Cell* 138 (1) (2009) 90–103.
- [65] P. Martinez, M. Thanasoula, P. Munoz, C. Liao, A. Tejera, C. McNees, J.M. Flores, O. Fernandez-Capetillo, M. Tarsounas, M.A. Blasco, Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice, *Genes Dev.* 23 (17) (2009) 2060–2075.
- [66] H. Takai, E. Jenkinson, S. Kabir, R. Babul-Hirji, N. Najm-Tehrani, D.A. Chitayat, Y.J. Crow, T. de Lange, A. POT1, Mutation implicates defective telomere end fill-in and telomere truncations in Coats plus, *Genes Dev.* (2016).
- [67] M. Hagiwara, T. Komatsu, S.-s. Sugiura, R. Isoda, H. Tada, N. Tanigawa, Y. Kato, N. Ishida, K. Kobayashi, K. Matsushita, POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439 (3) (2013) 413–417.
- [68] E.L. Denchi, T. de Lange, Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1, *Nature* 448 (7157) (2007) 1068.
- [69] Y. Chen, Y. Yang, M. van Overbeek, J.R. Donigian, P. Baciú, T. de Lange, M. Lei, A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins, *Science* 319 (5866) (2008) 1092–1096.
- [70] A. Smorzewska, B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M.R. Schaefer, G. Schnapp, T. de Lange, Control of human telomere length by TRF1 and TRF2, *Mol. Cell. Biol.* 20 (5) (2000) 1659–1668.
- [71] B. van Steensel, A. Smorzewska, T. de Lange, TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions, *Cell* 92 (3) (1998) 401–413.
- [72] R. Rai, Y. Chen, M. Lei, S. Chang, TRF2-RAP1 is required to protect telomeres from engaging in homologous recombination-mediated deletions and fusions, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10881.
- [73] P. Munoz, R. Blanco, G. de Carcer, S. Schoeftner, R. Benetti, J.M. Flores, M. Malumbres, M.A. Blasco, TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis, *Mol. Cell. Biol.* 29 (6) (2009) 1608–1625.
- [74] P. Martinez, G. Gomez-Lopez, F. Garcia, E. Mercken, S. Mitchell, J.M. Flores, R. de Cabo, M.A. Blasco, RAP1 protects from obesity through its extratelomeric role regulating gene expression, *Cell Rep.* 3 (6) (2013) 2059–2074.
- [75] M.T. Duong, E. Sahin, RAP1: protector of telomeres, defender against obesity, *Cell Rep.* 3 (6) (2013) 1757–1758.
- [76] P. Martinez, G. Gomez-Lopez, D.G. Pisano, J.M. Flores, M.A. Blasco, A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance, *Aging Cell* (2016).
- [77] S. Kabir, D. Hockemeyer, T. de Lange, TALEN gene knockouts reveal no requirement for the conserved human shelterin protein Rap1 in telomere protection and length regulation, *Cell Rep.* 9 (4) (2014) 1273–1280.
- [78] H. Teo, S. Ghosh, H. Luesch, A. Ghosh, E.T. Wong, N. Malik, A. Orth, P. de Jesus, A.S. Perry, J.D. Oliver, N.L. Tran, L.J. Speiser, M. Wong, E. Saez, P. Schultz, S.K. Chanda, I.M. Verma, V. Tergaonkar, Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression, *Nat. Cell Biol.* 12 (8) (2010) 758–767.
- [79] Y. Kidani, S.J. Bensinger, Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity, *Immunol. Rev.* 249 (1) (2012) 72–83.
- [80] G. Derosa, A. Sahebkar, P. Maffioli, The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice, *J. Cell. Physiol.* 233 (1) (2018) 153–161.
- [81] P. Martinez, M. Thanasoula, A.R. Carlos, G. Gomez-Lopez, A.M. Tejera, S. Schoeftner, O. Dominguez, D.G. Pisano, M. Tarsounas, M.A. Blasco, Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites, *Nat. Cell Biol.* 12 (8) (2010) 768–780.
- [82] G.C. Rowe, S. Raghuram, C. Jang, J.A. Nagy, I.S. Patten, A. Goyal, M.C. Chan, L.X. Liu, A. Jiang, K.C. Spokes, D. Beeler, H. Dvorak, W.C. Aird, Z. Arany, PGC-1alpha induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle, *Circ. Res.* 115 (5) (2014) 504–517.
- [83] E. Sahin, S. Colla, M. Liesa, J. Moslehi, F.L. Muller, M. Guo, M. Cooper, D. Kotton, A.J. Fabian, C. Walkey, R.S. Maser, G. Tonon, F. Foerster, R. Xiong, Y.A. Wang, S.A. Shukla, M. Jaskelioff, E.S. Martin, T.P. Heffernan, A. Protopopov, E. Ivanova, J.E. Mahoney, M. Kost-Alimova, S.R. Perry, R. Bronson, R. Liao, R. Mulligan, O.S. Shirihai, L. Chin, R.A. DePinho, Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise, *Nature* 470 (7334) (2011) 359–365.
- [84] V.M. Mikhailov, I.A. Gamalei, Telomere shortening is the main mechanism of natural and radiation aging, *Radiation Environ. Biophys.* 50 (3) (2010) 269–275.
- [85] D. Revesz, Y. Milanese, J.E. Verhoeven, B.W. Penninx, Telomere length as a marker of cellular aging is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (12) (2014) 4607–4615.
- [86] J.M. Starr, P.G. Shiels, S.E. Harris, A. Pattie, M.S. Pearce, C.L. Relton, I.J. Deary, Oxidative stress, telomere length and biomarkers of physical aging in a cohort aged 79 years from the 1932 Scottish Mental Survey, *Mech. Ageing Dev.* 129 (12) (2008) 745–751.
- [87] V. Cattani, N. Mercier, J.P. Gardner, V. Regnault, C. Labat, J. Maki-Jouppila, R. Nzietchueng, A. Benetos, M. Kimura, A. Aviv, P. Lacolley, Chronic oxidative stress induces a tissue-specific reduction in telomere length in cast/Ei mice, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (8) (2008) 1592–1598.
- [88] P. Newsholme, V.F. Cruzat, K.N. Keane, R. Carlessi, P.I. de Bittencourt Jr., Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes, *Biochem. J.* 473 (24) (2016) 4527–4550.
- [89] D. Trachootham, W. Lu, M.A. Ogasawara, R.D. Nilsa, P. Huang, Redox regulation of cell survival, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (8) (2008) 1343–1374.
- [90] B. Halliwell, Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (3) (2011) 125–130.
- [91] B.I. Frohnert, A.R. Sinaiko, F.J. Serrot, R.E. Foncea, A. Moran, S. Ikramuddin, U. Choudry, D.A. Bernal, Increased adipose protein carbonylation in human obesity, *Obesity* 19 (9) (2011) 1735–1741.
- [92] H. Kocak, Y. Oner-Iyidogan, F. Gurdol, P. Oner, R. Suzme, D. Esin, H. Issever, Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin, *Clin. Exp. Med.* 7 (4) (2007) 173–178.
- [93] S.O. Olusi, Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.: J. Int. Assoc. Study Obes.* 26 (9) (2002) 1159–1164.
- [94] A.T. Kharroubi, H.M. Darwish, M.A. Akkawi, A.A. Ashareef, Z.A. Almasri, K.A. Bader, U.M. Khammash, Total antioxidant status in type 2 diabetic patients in palestine, *J. Diabetes Res.* 2015 (2015) 461271.
- [95] B. Poljsak, D. Suput, I. Milisav, Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 956792.

Supplementary Tables and Figures

Supplementary table 1. Primers' sequence and specific running conditions.

Gene reference	Target	Primer sequences	bp	Ann (°C)	Concentration (nM)	
					For	Rev
	Telomere sequence	5'GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGT GAGGGTGAGGGT3' 5'TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCT ATCCCTATCCCTA3'	>76*	54	300	1,125
NM_001002.3 NM_053275.3	<i>36B4</i>	5'CAGCAAGTGGAAGGTGTAATCC3' 5'CCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'	75	58	300	500
NM_017489.2 NM_003218.3	<i>TRF1</i>	5'GCCCTGATGATTTGGGGTTC3' 5'TGCCATTTCCATACAACAGC3'	106	58	62.5	125
NM_005652.4	<i>TRF2</i>	5'GTGCTGTGCGGGATTGAAG3' 5'GGATTGACCACTGCTTCTG3'	142	59	62.5	31.25
NM_018975.3	<i>RAP1</i>	5'ATGATCCACCCACACCTGAG3' 5'GGAAGGCCTGTGTAAGTGTG3'	165	60	100	100
NM_000391.3	<i>TPP1</i>	5'TGTTCCACGGCCTTCATAC3' 5'CTGACCACCCAGTAGCCATC3'	155	59.5	62.5	15.62
NM_001042594.1 NM_015450.2	<i>POT1</i>	5'CGGAGAACAAGCGACTATGC3' 5'TAGGAAGAGTTTAGGCGGGC3'	102	59	62.5	125
NM_001288747.1 NM_001363.4 NM_001142463.2	<i>DKC1</i>	5'CTGCTATGGGGCCAAGATTA3' 5'GCAGATTGCTTCTCCTTTGG3'	106	57	75	75
NM_198253.2 NM_001193376.1	<i>TERT1**</i>	5'AGCACCGTCTGCGTGAG3' 5'AGCACCGTCTGCGTGAG3'	71	60	100	100
NM_198253.2 NM_001193376.1	<i>TERT2**</i>	5'CATTTTCATCAGCAAGTTTGAAG3' 5'TTTCAGGATGGAGTAGCAGAGG3'	86	60	100	100
NM_001193376.1 NM_198253.2	<i>TERT3**</i>	5'TCTCTACCTTGACAGACCTCC3' 5'GCACTGGACGTAGGACTTGG3'	197	60	100	100
NM_000576.2	<i>IL-1β</i>	5'TGGCCCTAACAGATGAAGTG3' 5'GAAGGTGCTCAGGTCATTCTC3'	199	57	100	100
NM_000594.3	<i>TNF-α</i>	5'TCTCTCTAATCAGCCCTCTGG3' 5'GCTTGAGGGTTTGCTACAAC3'	94	60	100	100
NM_006098	<i>GNB2L1</i>	5'GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG3' 5'GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC3'	224	60	100	100

*Minimum expected size of telomeric sequence fragments observed on agarose gel due to the sum of primer sizes. **Three different primers were designed targeting the amplification of human telomerase catalytic subunit. Abbreviations: bp: base pair; Ann (°C): Annealing temperature in Celsius; nM: Nanomolar; For: Forward; Rev: Reverse. *TRF1*: Telomeric repeat binding factor; *TRF2*: Telomeric repeat binding factor 2; *RAP1*: Repressor/activator protein 1; *TPP1*: Adrenocortical dysplasia protein homolog; *POT1*: Protection of telomeres protein 1; *DKC1*: Dyskerin; *TERT*: Catalytic subunit of the telomerase holoenzyme complex; *IL-1 β* : Interleukin 1 beta; *TNF- α* : Tumor necrosis factor alpha; *GNB2L1*: Human guanine nucleotide binding protein (G protein), b-polypeptide 2-like 1.

Supplementary table 2. Results from imputed and non-imputed incomplete data sets.

	Imputed data [Median (IQR) / n]	Non-imputed data [Median (IQR) / n]	p value
<i>TRF1</i>	0.97 (0.59 – 1.92) / 66	0.97 (0.59 – 1.92) / 66	1.0000
<i>TRF2</i>	1.26 (0.72 – 2.47) / 66	1.18 (0.52 – 2.19) / 63	0.4677
<i>RAP1</i>	1.20 (0.57 – 2.05) / 66	1.07 (0.56 – 2.09) / 63	0.9205
<i>POT1</i>	1.17 (0.69 – 2.30) / 66	0.90 (0.47 – 2.17) / 37	0.2780
<i>TPP1</i>	1.16 (0.64 – 1.82) / 66	1.16 (0.59 – 1.85) / 62	0.9782
<i>DKC1</i>	1.25 (0.87 – 1.65) / 66	1.22 (0.65 – 1.62) / 45	0.6311
<i>TERT*</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	
8-iso-P content	4.56 (4.21 – 5.13) / 66	4.33 (4.13 – 5.02) / 35	0.1932
Carbonyl content	11.66 (7.91 – 17.60) / 66	11.25 (7.71 – 18.66) / 57	0.8388
TRAP (1-AUC)	0.50 (0.38 – 0.58) / 66	0.50 (0.38 – 0.58) / 63	0.8815
TAR (1-AUC)	0.99 (0.99 – 0.99) / 66	0.99 (0.99 – 0.99) / 63	0.8870
SH content	0.72 (0.40 – 1.00) / 66	0.68 (0.37 – 1.00) / 59	0.7930
GSH content	0.38 (0.21 – 0.64) / 66	0.36 (0.19 – 0.62) / 57	0.6052

Results shown with median IQR (25-75%) / sample size. Abbreviations: n: sample size; IQR: Interquartile range; TRF1: Telomeric repeat binding factor; TRF2: Telomeric repeat binding factor 2; RAP1: Repressor/activator protein 1; TPP1: Adrenocortical dysplasia protein homolog; POT1: Protection of telomeres protein 1; DKC1: Dyskerin; TERT: Catalytic subunit of the telomerase holoenzyme complex; GNB2L1: Human guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1; TRAP: Total reactive antioxidant potential; TAR: Total Antioxidant Reactivity; SH: Sulfhydryl group; GSH: Reduced glutathione; AUC: Area under the curve; *nd*: *Non-detected*.

Supplementary table 3. Baseline and demographic characteristics from second patient recruitment.

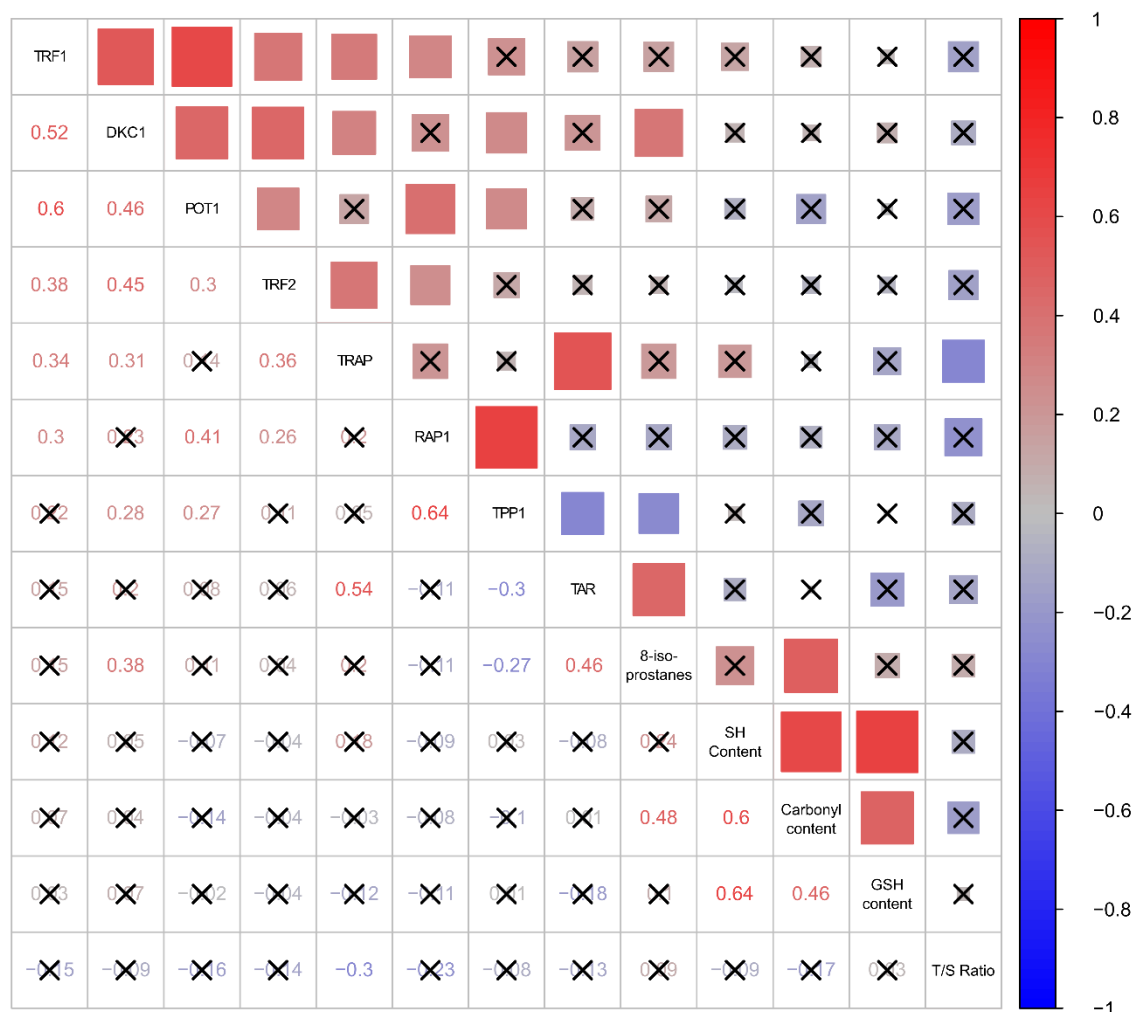
	Groups		p value
	Control (n = 8)	Obese (n = 10)	
Gender (male), n/total (%)	3/8 (37.5)	6/10 (60)	0.6372
Age (years), median (IQR)	37.5 (23.3 - 53.0)	39.0 (23.3 – 48.5)	0.8678
BMI, median (IQR)	23.2 (21.3 – 24.5)	57.5 (50.5 – 64.5)	< 0.0001
Physical activity, n/total (%)	0/8 (0)	0/10 (0)	–
Comorbidities, n/total (%)			
Dyslipidemia	0/8 (0)	2/6* (33.3)	–
Hepatic steatosis	0/8 (0)	1/6* (16.7)	–
Hypertension	0/8 (0)	1/6* (16.7)	–
Metabolic syndrome	0/8 (0)	0/6* (0)	–
Type 2 diabetes mellitus	0/8 (0)	0/6* (0)	–

IQR = Interquartile range

Results are shown with number (percent) or median IQR (25-75%)

Bolded results indicate significant differences between groups (95% confidence interval)

*Unavailable data (comorbidities) from 4 patients with obesity.



Supplementary Figure 1. Correlation plot showing r coefficients (sized and colored squares) and p values among all sets of observed variables. The absence of correlation is represented by an X inside the boxes. Abbreviations: TRF1: Telomeric repeat binding factor; TRF2: Telomeric repeat binding factor 2; RAP1: Repressor/activator protein 1; TPP1: Adrenocortical dysplasia protein homolog; POT1: Protection of telomeres protein 1; DKC1: Dyskerin; TRAP: total non-enzymatic antioxidant capacity; TAR: total non-enzymatic antioxidant reactivity; GSH: Reduced glutathione.

II.3 Capítulo 3: Indução do fenótipo senescente mediado por disfunção mitocondrial em células tronco adipo-derivadas através da exposição crônica ao ambiente obesogênico.

II.3.1 Justificativa

Diversos estudos sugerem uma conexão entre mecanismos que visam elucidar uma associação entre função mitocondrial, parâmetros oxidativos, e a indução do fenótipo senescente no contexto da obesidade. Entretanto, trabalhos recentes levantam a hipótese de que a modulação funcional das ADSC no tecido adiposo, e, mais especificamente, o estado celular induzido pela senescência, contribui ativamente para o declínio da função celular, contribuindo para a progressão da obesidade. Dessa forma, a antecipação da disfunção celular das ADSC em decorrência da obesidade, poderia refletir complicações metabólicas semelhantes às aquelas observadas no envelhecimento.

As ADSC de tecido adiposo de indivíduos portadores de obesidade apresentam funções diferentes em comparação com tecidos de indivíduos eutróficos. A capacidade de induzir angiogênese e, portanto, evitar um microambiente hipóxico e imunomodulatório (com manutenção do perfil de macrófagos no estado anti-inflamatório) estão reduzidas no contexto da obesidade. Entretanto, nenhum desses trabalhos aborda aspectos relacionados à disfunção metabólica ou senescência. Ainda, no intuito de contornar a heterogeneidade de resultados decorrentes, em parte, das características fenotípicas, genotípicas, idade, gênero, presença de comorbidades, tempo da doença, medicação, entre outras, neste trabalho utilizamos uma cultura primária de ADSC (clone PT-5006) de origem humana, derivadas de um único doador. Nesse sentido, nos objetivos desse trabalho escolhemos explorar mecanismos celulares de indução de senescência dependentes da disfunção energética-metabólica no contexto da obesidade.

II.3.2 Metodologia

II.3.2.1 Sujeitos da pesquisa

Utilizamos uma sub-amostra de um trabalho previamente publicado (Grun et al. 2018). Foram incluídos indivíduos com idade entre 18 e 65 anos e classificados com base no cálculo do índice de massa corporal (IMC) e comorbidades associadas à obesidade. Destes, 14 indivíduos compuseram o grupo portadores de obesidade grau III ($IMC \geq 40,0 \text{ kg/m}^2$) sem síndrome metabólica, caracterizada por um conjunto de condições metabólicas que aumentam o risco de CVD e DM2 (O'Neill e O'Driscoll 2015, Grundy 2016). Os indivíduos foram recrutados no período transoperatório de cirurgia bariátrica no Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS). Também foram recrutados 15 indivíduos eutróficos ($18,5 \leq IMC \leq 24,9$), os quais realizavam exames de rotina e que concordaram em participar do estudo.

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

Todos os participantes do estudo leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1). A coleta do material biológico foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFRGS (anexo 2) e da PUCRS (anexo 3) e conduzido de acordo com a Resolução 466/2012 do conselho Nacional

de Saúde e o *The Code of Ethics of the World Medical Association (WMA) – Declaration of Helsinki*.

II.3.2.2 Coleta do material biológico

Foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico dos indivíduos participantes. O sangue foi disposto em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5% como anticoagulante, e centrifugado a 400 xg por 15 minutos, em temperatura ambiente. A fração superior, correspondente ao plasma foi coletada e armazenada a -80°C até o momento dos experimentos.

II.3.2.3 Cultura de células

As ADSC humanas (hADSC) coletadas de lipoaspirado de cirurgia eletiva de indivíduo adulto eutrófico e sem diabetes foram adquiridas criopreservadas após primeira passagem da empresa LONZA (PT-5006, EUA). As hADSC foram caracterizadas por citometria de fluxo pela presença (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166) e ausência (CD14, CD31 e CD45) dos marcadores de superfície celular.

As hADSC foram cultivadas conforme especificado pelo distribuidor. Basicamente, as células foram mantidas em meio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) completo com baixa concentração de glicose (1,0 g/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e 0,25 µg de anfotericina B, e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Para a realização dos experimentos, o plasma dos participantes foi misturado para formar o *pool* de plasma de indivíduos eutróficos (n = 15) e o *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade (n = 14). As hADSC foram cultivadas e divididas em 3 grupos, tratadas com: (1) meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB (denominado de grupo CONTROLE), (2) DMEM completo suplementado com 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos (denominado de grupo PE), e (3) DMEM completo suplementado com 0,5% do *pool* de indivíduos portadores de obesidade (denominado de grupo PO). Os plasmas de indivíduos eutróficos e portadores de obesidade foram pareados por sexo e idade. Ainda, com o intuito de evitar a presença de comorbidades como fator de interferência, o grupo PO foi constituído por indivíduos portadores de obesidade sem a presença de comorbidades. As culturas celulares foram utilizadas quando as células estavam em fase exponencial de crescimento, entre as passagens 6 e 7. O tratamento crônico foi definido como cultura em presença do tratamento durante 10 dias, onde 50% do meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias. No final do dia 10, as hADSC foram coletadas por tripsinização (0,05% de Tripsina 1:250 em 0,02% de EDTA) para a realização dos ensaios.

II.3.2.4 Análise de confluência por citometria de imagem

Para análise de confluência celular, foi realizado o ensaio de citometria por imagem utilizando o leitor de placas SpectraMax i3 acoplado ao citômetro de imagem MiniMax 300 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com o módulo de imagem óptica e configuração de luz transmitida. A tecnologia de detecção de células StainFree™ permitiu a realização de ensaios de proliferação celular e citotoxicidade.

Essa tecnologia permite estimar a confluência de células aderentes ao plástico, de forma que os resultados sejam comparáveis às contagens de núcleos e células inteiras, quando utilizado corantes fluorescentes. Além disso, as células podem ser analisadas em tempo real sem interromper seu crescimento.

Dessa forma, as hADSC foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^3 células/mL. Após 24 h em cultura, foi iniciado o tratamento, análise de confluência e proliferação foi realizado nos seguintes 10 dias consecutivos. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de confluência em função do número de dias.

II.3.2.5 Análise de morte celular

A fim de avaliar o comprometimento celular relacionado a processos apoptóticos ou necróticos relacionado aos tratamentos, foi avaliada a viabilidade das hADSC utilizando a marcação por detecção de Anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). Assim, após 10 dias de tratamento, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS. Em seguida, 5×10^4 células foram suspensas em 100 μ L de Tampão de Ligação (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) contendo 3 μ L de Anexina V-FITC e 1 mg/mL de PI (BD Biosciences, EUA). Após 15 min de incubação, 300 μ L do tampão de ligação foram adicionados a cada amostra e analisados por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Foram adquiridos 20×10^3 eventos e os dados foram expressos como porcentagem de células positivas nos canais FL1-H (FITC) e/ou FL3-H (PI).

II.3.2.6 Análise da atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal)

O fenótipo senescente foi avaliado pela atividade da enzima lisossomal β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) utilizando o substrato C₁₂FDG (5-dodecanoilaminofluoresceína di- β -D-galactopiranosídeo) como descrito previamente (Debacq-Chainiaux et al. 2009). C₁₂FDG é uma molécula permeável a membrana plasmática, que após ser internalizada pelas células, sofre hidrólise pela atividade da enzima β -gal e libera a molécula de fluoresceína, emitindo fluorescência (espectro de excitação/emissão: 490/514 nm).

As hADSC foram semeadas em lamínulas de 12 mm de diâmetro e tratadas como supracitado. Após o décimo dia de tratamento, as células foram incubadas com C₁₂FDG e Hoescht 33258 (espectro de excitação/emissão 352/461 nm, Invitrogen, EUA) 2,5 μ g/mL para a marcação dos núcleos. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal de varredura a laser (Olympus FV1000). Imagens de dez seções confocais de 0,7 μ M foram obtidas em paralelo a lamínula (seções XY). Assim, as imagens foram reconstruídas tridimensionalmente no eixo Z. Para cada amostra, quatro imagens representativas foram analisadas de forma qualitativa com o programa Olympus FluoView FV1000, versão 4.2. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. Todas as imagens obtidas por microscopia confocal foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS (Viamão, RS).

II.3.2.7 Análise de morfometria nuclear (NMA)

A análise de morfometria nuclear baseia-se na exploração de parâmetros relacionados à morfologia do núcleo de células vivas mantidas em cultura celular, para avaliar características morfológicas, as quais classificam as células quanto à viabilidade e regularidade nuclear, eventos derivados dos processos decorrentes do ciclo celular. Nesse sentido, o núcleo das células combina fatores como: Normal (N), Pequeno (P), Pequeno e Regular (PR), Pequeno e Irregular (PI), Grande e Regular (GR), Grande e Irregular (GI) e Irregular (I), os quais constituem um Índice de Irregularidade Nuclear (NII) (Filippi-Chiela et al. 2012).

Para a realização dos experimentos, ao final do tratamento por 10 dias, as hADSC aderidas às placas de cultura foram lavadas com PBS e marcadas *in vivo* com Hoescht 33258 5µg/mL por 40 minutos a temperatura ambiente, sob proteção da luz. Após, foram lavadas com PBS a fim de remover o excesso de marcação e então observadas por microscopia. As imagens foram analisadas em microscópio EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) (espectro de excitação/emissão:385/420 nm) e a quantificação dos parâmetros nucleares realizada com o programa *Image Pro Plus 6.0* (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Os parâmetros relacionados à regularidade e viabilidade celular foram classificados com base na divisão de quadrantes e compreenderam os seguintes grupos: normal (N), irregular (I), apoptose (PR, P ou PI) ou senescência (GR e GI) geradas a partir do NII. Os *plugins*, programas e as planilhas utilizadas como modelo de análise para o NMA estão disponibilizadas pelo grupo coordenado pelo Professor Dr. Guido Lenz, do Departamento de Biofísica da UFRGS, em

<http://www.ufrgs.br/labsinal/nma/>. Os dados foram apresentados como área *versus* NII.

II.3.2.8 Análise da biomassa e potencial de membrana mitocondrial

A biomassa e o potencial de membrana mitocondrial das hADSC foram avaliados utilizando sondas fluorescentes. Foi utilizado o corante *MitoTracker™ Green FM* (MTG) (espectro de excitação/emissão: 490/516 nm, Thermo Fisher, EUA), o qual possui afinidade por lipídios de membrana mitocondriais e *MitoTracker™ Red CMXRos* (MTR) (espectro de excitação/emissão: 579/599 nm, Thermo Fisher, EUA), onde o acúmulo de marcação está associado ao potencial de membrana mitocondrial de células vivas.

Após 10 dias de tratamento, 5×10^4 hADSC foram removidas da placa de cultura por tripsinização, lavadas com PBS e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 30 minutos com meio de marcação contendo DMEM (sem adição de SFB) suplementado com 100 nM de MTG e 100 nM de MTR. Ao final da marcação, as células foram lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo, com o equipamento FACSCalibur™ (BD Biosciences, EUA). Foram adquiridos 20×10^3 eventos e os dados foram expressos pela média da intensidade de fluorescência (MFI) e analisados pelo programa FlowJo 7.0 (LLC, EUA).

De forma paralela, 2×10^4 hADSC foram lavadas com PBS e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 30 minutos com DMEM sem adição de SFB contendo 100 nM de MTG e 100 nM de MTR. As imagens foram analisadas de forma qualitativa em microscópio EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000).

II.3.2.9 Análise de organelas vacuolares ácidas por citometria de fluxo

O corante laranja de acridina (AO) (Sigma Aldrich, EUA) é um marcador fluorescente permeável à membrana celular. Em condições de pH ácido, AO se torna uma molécula com carga positiva e, devido a essa característica, fica retida no interior das células, emitindo fluorescência na cor vermelha em compartimentos ácidos (espectro de excitação/emissão: 488/530 nm). Dessa forma, a intensidade de fluorescência vermelha é proporcional à acidificação intracelular devido à atividade lisossomal relacionada ao processo de autofagia (Traganos e Darzynkiewicz 1994, Thome et al. 2016).

Após 10 dias de tratamento, 5×10^4 hADSC foram removidas da placa de cultura por tripsinização, lavadas com PBS e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 15 minutos com meio de marcação contendo 1µg/mL de AO. Após, as células foram lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o equipamento FACSCalibur™ (BD Biosciences). Foram adquiridos 30×10^3 eventos e os dados foram expressos por MFI e analisados pelo programa FlowJo 7.0 (LLC, EUA).

II.3.2.10 Análise do conteúdo de superóxido (O₂^{•-}) mitocondrial

Para avaliar a produção do ânion superóxido (O₂^{•-}) mitocondrial, as células vivas foram marcadas com a sonda MitoSOX™ Red (espectro de excitação/emissão: 550/647 nm, Molecular Probes, EUA). No final da exposição das células aos tratamentos, as células foram tripsinizadas, lavadas PBS e marcadas com 5 µM da sonda MitoSOX™ Red e incubadas a 37°C por 10 minutos, novamente lavadas com

PBS e analisadas. A aquisição de dados e análise foi realizada por citometria de fluxo, no canal FL2-H, utilizando o aparelho BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, EUA). Os dados foram expressos por porcentagem (%) da população e pela MFI.

II.3.2.11 Extração de RNA e síntese de cDNA

Ao final do dia 10 de tratamento, o RNA total foi extraído a partir de 10^4 hADSC utilizando o reagente TRIzol LS® (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA total foi avaliada em espectrofotômetro pela análise da razão das absorvâncias 260/280 nm utilizando o equipamento *BioPhotometer Plus* (Eppendorf, Alemanha). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa MultiScribe™ do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA) e armazenados a -20°C até o momento dos experimentos.

II.3.2.12 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)

A informação da sequência gênica analisada (disponíveis em <http://www.ensembl.org> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) e usada para desenhar os iniciadores para os genes *MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *FIS1*, *SQSTM1*, *TRF1* e Subunidade 1 da NADH desidrogenase mitocondrial (*MT-ND1*) usando um software disponível pela *Integrated DNA Technologies* (disponível em <http://www.idtdna.com>). A expressão dos genes relacionado à função mitocondrial supracitados foi realizada utilizando a enzima Taq DNA Polimerase 5U/µL (4G pesquisa e desenvolvimento, RS,

Brasil) e o sistema de detecção SYBR® Green (Molecular Probes, EUA), e a expressão gênica normalizada usando os genes constitutivos Fosforibosiltransferase Hipoxantina 1 (*HPRT1*) e Subunidade 2 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G) (*GNB2L1*). A sequência dos iniciadores, concentração e as condições específicas de corrida são mostradas na Tabela 1. A expressão dos genes *CDNK1A* e *CDNK2A*, relacionados ao fenótipo senescente, foi realizada utilizando a tecnologia de detecção *Taqman* e normalizados pela expressão do gene constitutivo Subunidade lateral P0 da proteína ribossômica (*RPLP0*).

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (*qPCR*) foram realizadas em placa de 96 poços no instrumento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados 5µL das amostras de cDNA (diluídos na razão 1:10) em triplicata para cada par de iniciadores e a especificidade dos produtos amplificados foi confirmada por análises das curvas de dissociação no final de cada reação. Ainda, o tamanho do amplicon foi confirmado em corrida eletroforética em gel de agarose (3%) e visualização com luz UV ($\lambda = 285 \text{ nm}$). As triplicatas com desvio padrão $\geq 0,3 \text{ cT}$ foram excluídas e executadas novamente. Os dados de expressão gênica foram calibrados pela média do ΔcT de todas amostras, e os resultados foram expressos utilizando o método $\Delta\Delta\text{cT}$ (Livak e Schmittgen 2001).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores e condições das reações de qPCR.

Referência do gene	Alvo	Sequência dos iniciadores (pares de primers)	Amp (pb)	An (°C)	Concentração (nM)	
					Dir	Rev
NM_033540.3	<i>MFN1</i>	5' AGGAACTGATGGAGATAAAGCC 3' 5' ACACGTACAAGACAGCCAG 3'	132	62	100	100
NM_014874.3	<i>MFN2</i>	5' TCAGGAATAAAGCCGGTTGG 3' 5' TGGGTGCTTCATTCTCTTGG 3'	199	60	200	200
NM_130834.3	<i>OPA1</i>	5' AATGTAATGAGGAGCACCCAG 3' 5'CGACAAAGGTTACAATGGTTTAGAG 3'	172	60	200	200
NM_012062.5	<i>DRP1</i>	5' CAGACTTTGCTGATGCTTGTG 3' 5' CTGCTCTGAATTAAGTTGCCATC 3'	193	60	200	200
NM_016068.3	<i>FIS1</i>	5' TGACATCCGTAAAGGCATCG 3' 5' CTTCTCGTATTCTTGAGCCG 3'	121	62	200	200
NM_003900.5	<i>SQSTM1</i>	5' AAGAACTATGACATCGGAGCG 3' 5' AGAGGTGGGCAAAAGTGG 3'	84	60	200	200
NM_003218.3	<i>TRF1</i>	5' GCCCTGATGATTTGGGGTTC 3' 5' TGCCATTTTCCATACAAACAGC 3'	106	58	62.5	125
NC_012920.1*	<i>MT-ND1</i>	5' GGAGTAATCCAGGTCGGT 3' 5' TGGGTACAATGAGGAGTAGG 3'	265	60	200	200
NM_000194.3	<i>HPRT1</i>	5' TGCTGAGGATTTGGAAAGGG 3' 5' ACAGAGGGCTACAATGTGATG 3'	115	60	100	100
NM_006098	<i>GNB2L1</i>	5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG 3' 5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC 3'	224	60	100	100

Abreviações: pb: pares de base; An (°C): temperatura de anelamento em graus Celsius; nM: nanomolar; Dir: direto; Rev: Reverso. *MFN1*: Mitofusina 1; *MFN2*: Mitofusina 2; *OPA1*: Atrofia Óptica 1; *DRP1*: Relacionada à Dinamina 1; *FIS1*: Proteína de Fissão Mitocondrial 1; *SQSTM1 (P62)*: Sequestossomo-1; *MT-ND1*: Subunidade 1 da NADH desidrogenase mitocondrial; *TRF1*: Fator de Ligação de Repetição Telomérica 1; *HPRT1*: Fosforibosiltransferase Hipoxantina 1 *GNB2L1*: Subunidade 2 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G).

Referências dos genes retiradas da base de dados ENSEMBL, disponível em <https://www.ensembl.org/index.html> e *da base de dados NCBI, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4535>

II.3.2.13 Avaliação do acúmulo de gotas lipídicas

O AdipoRed™ (Lonza, EUA) é um composto hidrofílico, que quando clivado em um ambiente hidrofóbico, torna-se fluorescente. A fluorescência emitida ($\lambda = 572$ nm) pode ser quantificada e refletir o acúmulo de gotas lipídicas ou grau de diferenciação

das hADSC. Após 10 dias de tratamento com FBS ou plasma, 2×10^4 hADSC foram lavadas com solução salina fosfato (PBS) e incubadas com meio de marcação contendo $7,5 \mu\text{L/mL}$ de AdipoRed™ e incubadas a 15 minutos em temperatura ambiente até o momento da aquisição das imagens. Como controle positivo do experimento, hADSC foram induzidas à diferenciação a pré-adipócitos, utilizando moléculas indutoras de adipogênese [DMEM alta concentração de glicose ($4,5 \text{ g/L}$) suplementado com 10% SFB, Indometacina $200 \mu\text{M}$, insulina $10 \mu\text{M}$, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) $0,5 \mu\text{M}$, dexametasona $1 \mu\text{M}$ e rosiglitazona $10 \mu\text{M}$] (Scott et al. 2011). A aquisição das imagens foi realizada no microscópio EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000) (espectro de excitação/emissão $485/572 \text{ nm}$).

Para cada amostra, imagens de três campos foram adquiridas e a fluorescência do AdipoRed™ foi analisada e quantificada em 8-bit após transformação das imagens em escala de cinza, utilizando o programa de processamento de imagem Java ImageJ versão 1.8.0, disponível publicamente de forma gratuita (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Foram analisadas quatro células por imagem, adquiridas em escala de $200 \mu\text{m}$ (aumento de 200X), escolhidas aleatoriamente entre os campos.

II.3.2.14 Análise da expressão proteica de TRF-1 e Caspase-3 ativa

A expressão das proteínas TRF1 e Caspase-3 ativa foi analisada por citometria de fluxo. Após o tratamento de 10 dias, 5×10^4 hADSC foram marcadas com os anticorpos anti-TRF1 conjugado com Alexa Fluor-647 (espectro de excitação/emissão: $633/647 \text{ nm}$, Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anti-Caspase-3 ativa conjugado com PE (espectro de excitação/emissão: $488/577 \text{ nm}$, BD

Pharmingén™, EUA) e incubadas durante 30 minutos a 4°C protegidos da luz, utilizando o kit de ligação do fator de transcrição, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adquiridos 20×10^3 eventos e os dados foram analisados em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences) nos canais FL4-H e FL2-H. Os dados foram expressos por porcentagem (%) da população e MFI e analisados pelo programa FlowJo 7.0 (LLC, EUA).

II.3.2.15 Análises estatísticas

Os dados categóricos foram apresentados por frequência absoluta e relativa. As variáveis contínuas, como média e desvio padrão, conforme a simetria das variáveis. O teste D'Agostino-Pearson foi realizado a fim de verificar a normalidade na distribuição das amostras para cada variável. A comparação entre os grupos foi avaliada por ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Todos os testes foram bidirecionais e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas com os programas *IBM SPSS Statistics 23* (IBM Corporation, EUA) e *GraphPad Prism 6.01* (GraphPad Prism Software Inc., EUA).

II.3.3 Resultados

II.3.3.1 Características demográficas dos participantes do estudo

Os dados clínicos e demográficos dos indivíduos eutróficos e portadores de obesidade estão descritos na Tabela 2. Os indivíduos portadores de obesidade foram clinicamente classificados como portadores de obesidade grau III ($p < 0,0001$) e ausência de síndrome metabólica. Não houve diferença na frequência de sexo ($p = 0,1761$), assim como na idade ($p = 0,7100$) entre os grupos.

Tabela 2. Características demográficas dos participantes do estudo.

	Grupos		valor p
	Eutróficos (n = 15)	Obesos (n = 14)	
Sexo (masculino), n/total (%)	8/15 (53,3)	4/14 (28,6)	0,1761
Idade (anos), mediana (IIQ)	29,0 (27,0 – 37,0)	34,5 (25,0 – 38,7)	0,7100
IMC (kg/m ²), mediana (IIQ)	22,1 (20,7 – 23,9)	49,3 (43,5 – 50,6)	< 0,0001
Atividade física, n/total (%)	0/15 (0)	0/14 (0)	–
Comorbidades, n/total (%)			
Diabetes mellitus tipo 2	0/15 (0)	1/14 (7,14)	–
Dislipidemia	0/15 (0)	7/14 (50,0)	–
Esteatose hepática	0/15 (0)	6/14 (42,8)	–
Hipertensão	0/15 (0)	4/14 (28,6)	–
Síndrome metabólica	0/15 (0)	0/14 (0)	–

Abreviações: IMC: Índice de massa corporal; IIQ: Intervalo interquartil;

Resultados demonstrados em frequência (porcentagem) ou mediana IIQ (25-75%);

Resultados em negrito indicam diferenças entre os grupos, avaliado por teste t não pareado (intervalo de confiança de 95%).

II.3.3.2 Altas concentrações de plasma induzem morte de hADSC

A fim de avaliar a toxicidade da suplementação com plasma, foram testadas diferentes concentrações de plasma de indivíduos eutróficos (PE) e portadores de obesidade (PO). Os resultados demonstraram que as concentrações mais elevadas (1,5 e 2%) de plasma (de ambos tratamentos) foram tóxicas e diminuíram a área de cobertura de hADSC em cultura, observadas no dia 8 ($p < 0,0001$, ANOVA de uma via, IC95%) (Figura 1A). Uma vez que os tratamentos com doses mais elevadas (1,5 e 2,0%) demonstraram alta toxicidade (Figura 1A) e o objetivo do trabalho foi induzir um ambiente inflamatório, de modo que as células respondessem a esse estímulo sem que houvesse morte celular, continuamos o trabalho com os tratamentos na condição de baixa concentração de plasma (0,5%). Para avaliar o tempo de duplicação celular, quantificamos de forma indireta, a área de confluência (Figura 1B). Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto à taxa de duplicação após 10 dias de tratamento (Figura 1C).

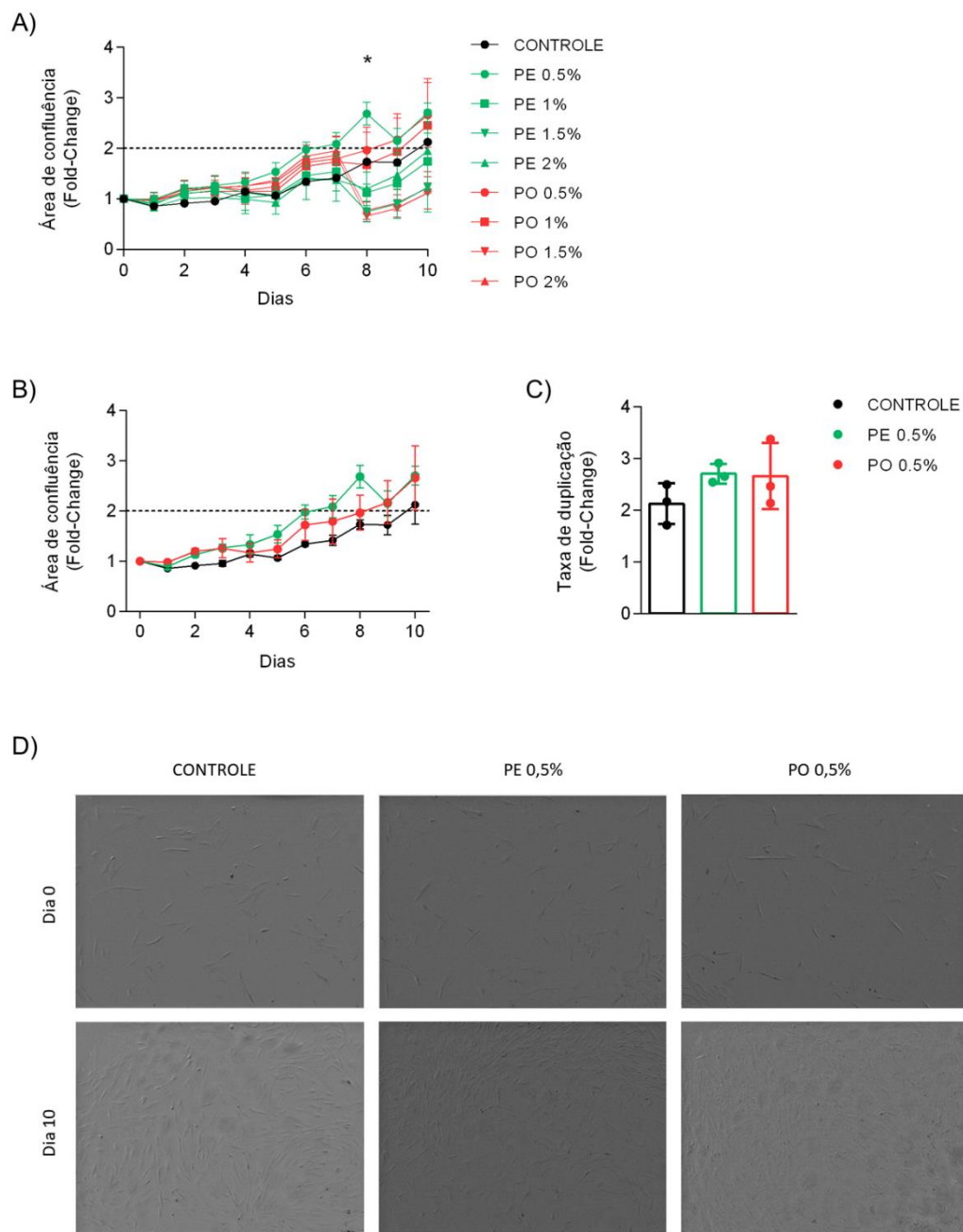


Figura 1. Altas concentrações de plasma induzem morte de hADSC. A) As hADSC foram expostas a diferentes concentrações de plasma de indivíduos eutróficos (PE) e portadores de obesidade (PO). **B)** Os tratamentos com baixas concentrações de plasma (0,5%) não demonstraram a diminuição na porcentagem de confluência, e foram selecionados para estudar a sinalização dependente de plasma nas hADSC. **C)** Ao final do décimo dia de tratamento, não observamos diferença na taxa de duplicação entre os grupos. **D)** Imagens representativas da cultura celular de hADSC no início (dia 0) e no final (dia 10) do tratamento com plasma. Os dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*), após o teste ANOVA de uma via, com intervalo de confiança de 95%. Abreviações: PE: pool de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: do pool de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura.

II.3.3.3 A exposição ao ambiente obesogênico não altera a viabilidade celular

A fim de simular a exposição crônica de um ambiente genotóxico, pró-inflamatório e pró-oxidativo, escolhemos avaliar as consequências da incubação com plasma em baixas concentrações (PE 0,5%) de indivíduos eutróficos (PE) e portadores de obesidade (PO) em comparação com o grupo controle (suplementado com SFB 10%). A cultura foi mantida durante 10 dias de tratamento até a análise da porcentagem de hADSC viáveis e mortas (apoptose e necrose). Nossos resultados não demonstram diferenças entre os grupos, quando comparados em relação à porcentagem de células viáveis ($p = 0,1394$), apoptose ($p = 0,3874$), apoptose tardia ($p = 0,0982$) ou necrose ($p = 0,0784$) (ANOVA de uma via, IC95%) (Figura 2A). A taxa de apoptose similar entre os tratamentos foi confirmada pela intensidade da expressão ($p = 0,6353$) (Figura 2B) e porcentagem ($p = 0,3546$) (ANOVA de uma via, IC95%) (Figura 2C) de células positivas para a enzima caspase-3.

Esses resultados sugerem que no contexto da obesidade, a baixa concentração de plasma avaliada não induz morte celular.

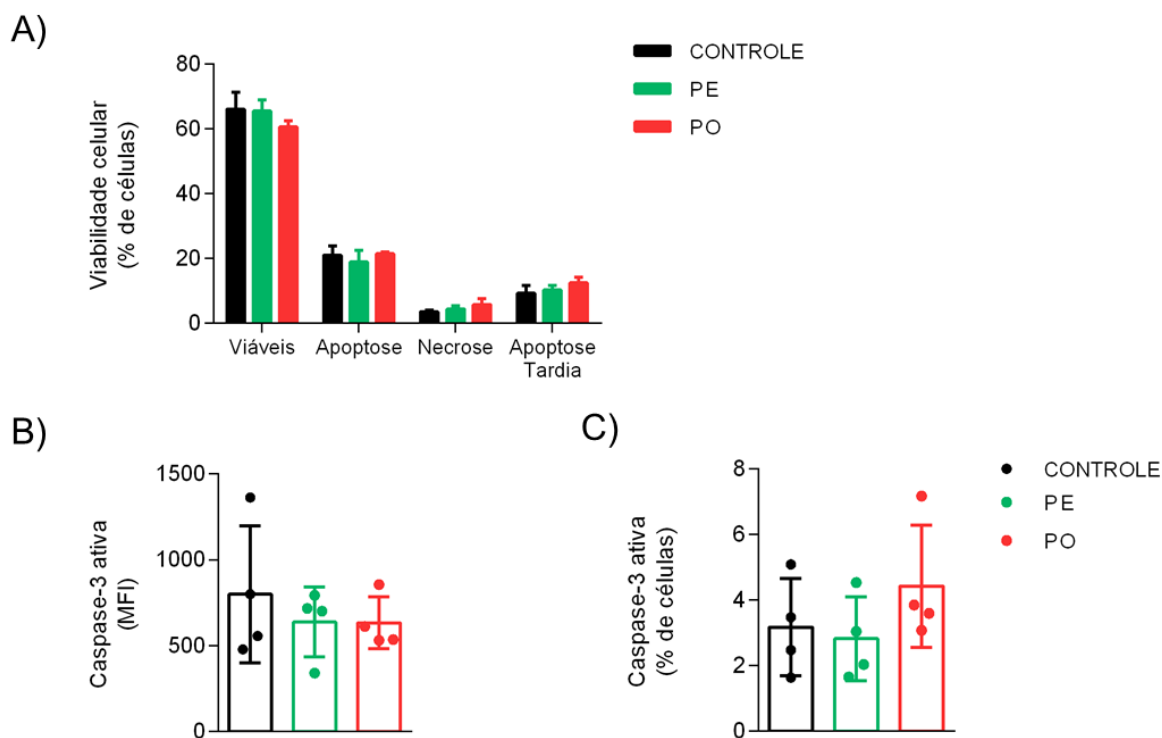


Figura 2. A exposição ao ambiente obesogênico não altera a viabilidade celular. A) hADCS foram tratadas por 10 dias com PE ou PO e analisadas para marcação por Anexina V e PI por citometria de fluxo. Não observamos diferenças entre os grupos em relação à porcentagem de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia ou em necrose. **B)** Gráfico de dispersão de pontos a partir de análises por citometria de fluxo para MFI **C)** ou expressão para a enzima ativa Caspase-3. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*), após o teste ANOVA de uma via, com intervalo de confiança de 95%. Abreviações: MFI: Média da intensidade de fluorescência; PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura.

II.3.3.4 Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz senescência

Dependendo do estímulo sinalizador, as células podem ativar vias de morte celular ou de senescência após a parada do ciclo celular. Nesse sentido, surgiu a hipótese de que a incubação com plasma poderia ser um mecanismo sinalizador para vias de indução de senescência. A análise das imagens obtidas por microscopia foi utilizada a fim de avaliar a indução do fenótipo senescente após 10 dias de tratamento.

Interessantemente, o tratamento com PO 0,5% induziu um aumento da atividade da enzima SA- β -gal quando comparado ao grupo controle, observado pelo aumento da detecção do substrato fluorogênico C₁₂FDG ($p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, IC95%) (Figura 3A e 3B). Ainda, avaliamos a expressão gênica dos inibidores de cinases dependente de ciclinas *CDKN1A* (P21) e *CDKN2A* (P16) – proteínas envolvidas na inibição da proliferação e parada do ciclo celular em resposta à estresses celulares, de modo que estejam envolvidos na indução (P21) e estabilização (P16) do fenótipo senescente. A análise dos dados demonstrou um aumento na expressão gênica de *CDKN1A* após o tratamento com PO 0,5% por 10 dias ($p = 0,0488$, teste t não pareado, IC95%) (Figura 3C), confirmando nossos dados, indicando um aumento da atividade da enzima AS- β -gal. Não detectamos a expressão gênica de *CDKN2A* em hADSC submetidas aos respectivos tratamentos (dados não mostrados).

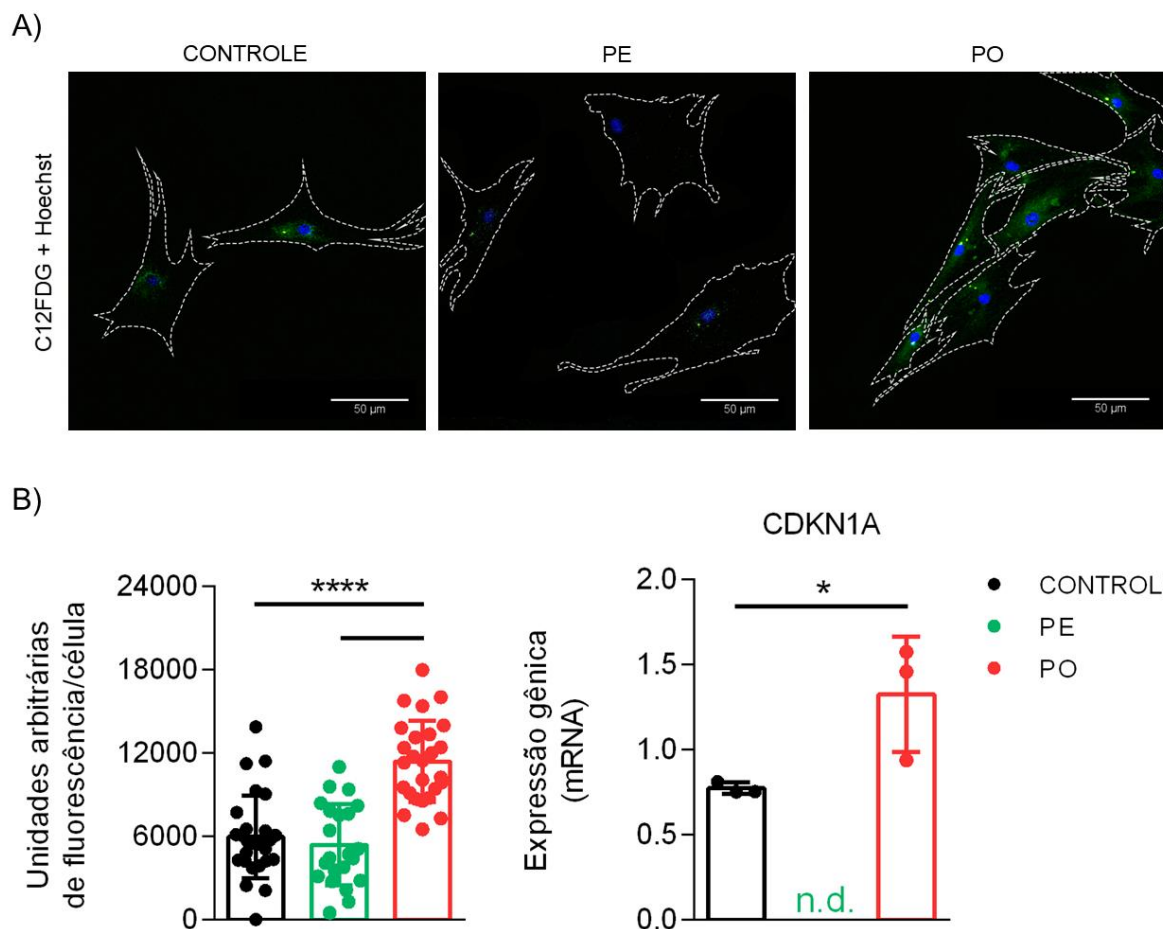


Figura 3. Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz senescência. A) Imagens representativas após 10 dias de tratamento, adquiridas por microscopia confocal. As linhas brancas segmentadas representam a delimitação celular pela membrana plasmática. **B)** As análises por imagem demonstraram um aumento na atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência, pela fluorescência do substrato $C_{12}FDG$. **C)** Houve um aumento da expressão do gene *CDKN1A* (P21) em hADSC tratadas com plasma de obesos por 10 dias. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,0001$ (****), após o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey (atividade da SA- β -gal) ou teste t não pareado (expressão gênica de *CDKN1A*), com intervalo de confiança de 95%. Abreviações: PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura; n.d.: não detectado.

II.3.3.5 Morfometria nuclear não indica senescência em hADSC tratadas com plasma

A fim de utilizar uma abordagem adicional e complementar os resultados avaliados pelo aumento da atividade da enzima SA- β -gal e o aumento na expressão de *CDKN1A* que indicaram ativação no fenótipo senescente em hADSC tratadas com PO 0,5%, realizamos o ensaio de morfometria nuclear. Avaliamos uma média de 30 núcleos por grupo após 10 dias de tratamento e os classificamos de acordo com os critérios morfológicos. Os dados obtidos pela NMA não indicam alteração da morfologia quanto a parâmetros relacionados à área ou índice de irregularidade nucleares (NII) ($p > 0,05$, ANOVA de uma via, IC95%) (Figura 4). Esses resultados sugerem que o aumento da atividade da SA- β -gal e a expressão de *CDKN1A* não foram acompanhados pelas alterações na morfologia nuclear, característico de células no estado de senescência.

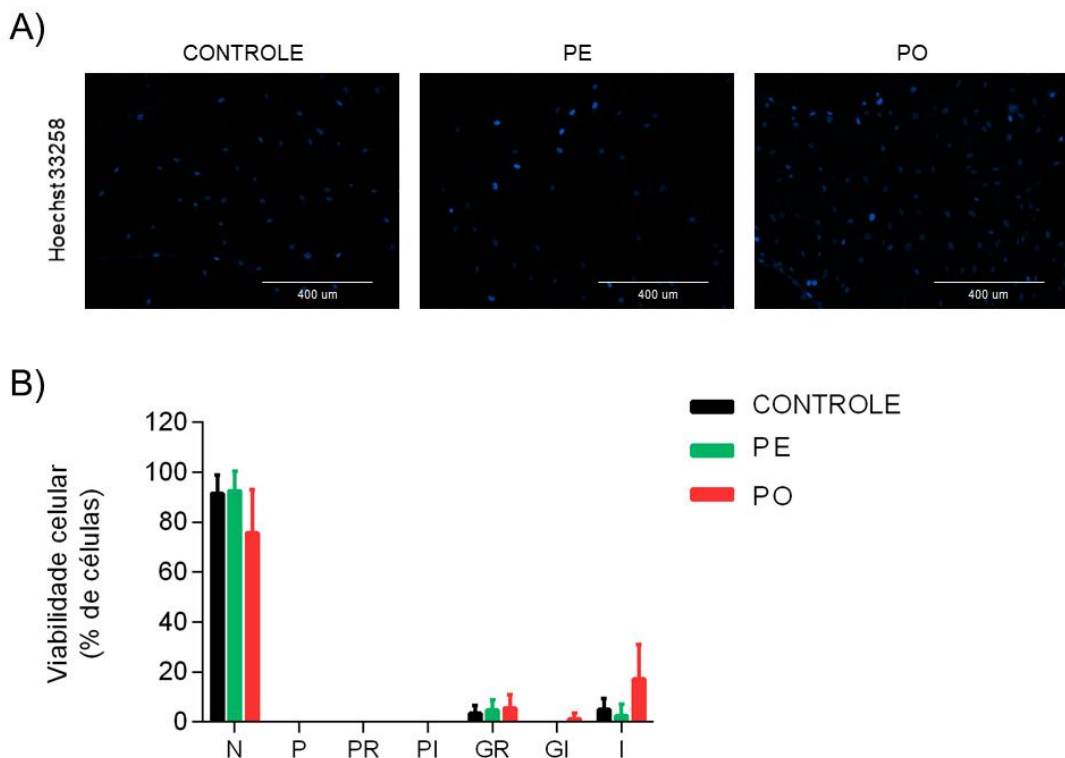


Figura 4. Morfometria nuclear não indica senescência em hADSC tratadas com plasma. A) Imagens representativas após 10 dias de tratamento, adquiridas por microscopia de fluorescência com núcleos marcados com Hoechst 33258 (azul). **B)** Gráfico de barras agrupando os resultados obtidos pela NMA, sem alteração da morfologia quanto a parâmetros relacionados à área ou índice de irregularidade nuclear (NII). Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). Abreviações: PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura; N: normal; P: pequeno; PR: pequeno e regular; PI: pequeno e irregular; GR: grande e regular; GI: grande e irregular; I: irregular.

II.3.3.6 Despolarização da membrana mitocondrial induzida pelo tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade

A perda de função mitocondrial observada em tecidos envelhecidos geralmente é acompanhada pela diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias, levando ao comprometimento da produção de energia pela cadeia respiratória. Nossos resultados demonstraram uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial (MTR, $p = 0,0010$) (Figuras 5A e B) mas não na biomassa mitocondrial (MTG, $p =$

0,1058) (Figura 5A e C) em ambos tratamentos com plasma. Ainda, observamos uma diminuição da função mitocondrial avaliada pela razão entre o potencial de membrana e a biomassa mitocondrial ($p = 0,0065$) (Figura D) (ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, IC95%).

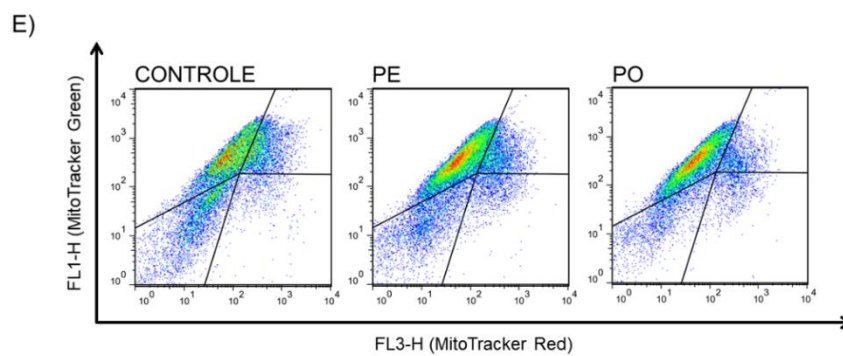
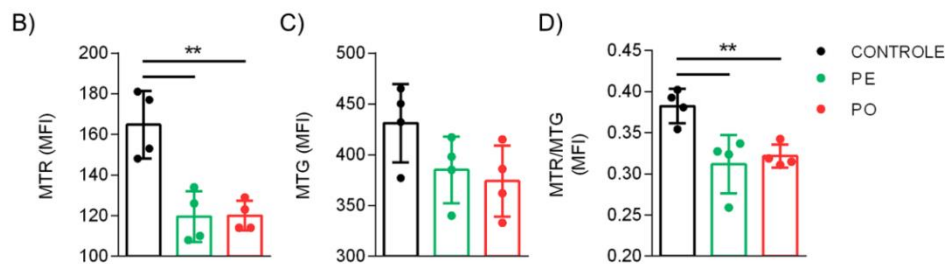
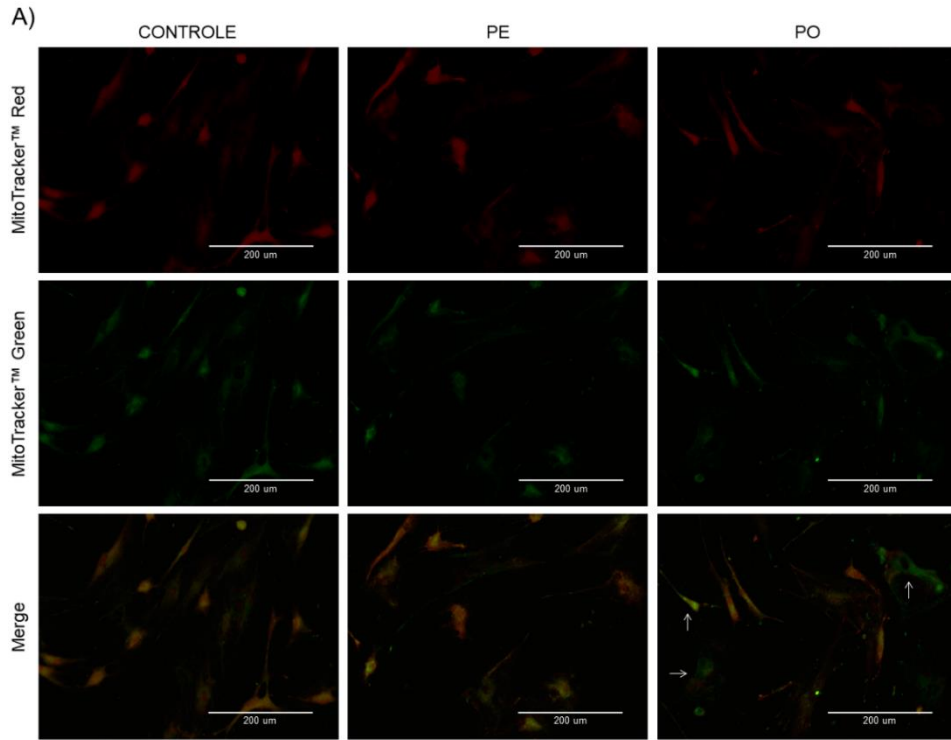


Figura 5. A exposição ao plasma de indivíduos portadores de obesidade induz a despolarização da membrana mitocondrial. Após 10 dias de tratamento, as células foram coletadas e coradas com os reagentes MTR e MTG, adquiridas e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Imagens representativas adquiridas por microscopia de fluorescência com marcação de MTR e MTG. As setas brancas exemplificam mitocôndrias com potencial de membrana comprometido. **B)** Houve uma diminuição da função (MTR), **C)** mas não na biomassa mitocondrial (MTG) tanto nas culturas tratadas com PE e PO, em relação à cultura controle. **D)** Após 10 dias de tratamento também observamos uma diminuição da função mitocondrial avaliada pela razão entre MTR/MTG em ambos os casos. **E)** Gráfico de pontos obtidos por FACS mostrando imagens representativas dos três tratamentos. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,01$ (**), após o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Abreviações: MFI: Média da intensidade de fluorescência; MTG: MitoTracker Green; MTR: MitoTracker Red; PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura.

II.3.3.7 Diminuição do conteúdo mitocondrial e comprometimento da autofagia induzidos pelo tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade

As mitocôndrias são organelas de alta complexidade, devido aos processos de biogênese, fissão e fusão, resultando em uma rede mitocondrial interconectada e dinâmica. A fim de avaliar a dinâmica do ciclo de vida mitocondrial, avaliamos a expressão dos genes relacionados à fusão mitocondrial. Os resultados obtidos não demonstram diferenças na expressão gênica de *MFN1* ($p = 0,5557$), *MFN2* ($p = 0,4689$) e *OPA1* ($p = 0,6549$) (teste t não pareado, IC95%) relacionados à fusão mitocondrial (Figura 6A). Não foi possível detectar a expressão gênica de *DRP1* e *FIS1* relacionadas à fissão mitocondrial. Também observamos uma diminuição na expressão gênica de *SQSTM1 (P62)* no tratamento PO 0,5% ($p = 0,0228$, teste t não pareado, IC95%) (Figura 6A). Interessantemente, observamos uma diminuição na expressão do *MT-ND1*, sugerindo uma diminuição na sinalização de biogênese mitocondrial em hADSC após o tratamento com PO 0,5% em relação ao grupo controle (avaliado pela razão da expressão do gene mitocondrial *MT-ND1* em relação

ao gene nuclear *HPRT1*) ($p = 0,0013$, teste t não pareado, IC95%) (Figura 6B). Nossos dados também sugerem uma diminuição da atividade celular autofágica após 10 dias de tratamento com PO 0,5% ($p = 0,0170$, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, IC95%), observados pela diminuição da marcação de compartimentos celulares ácidos (Figura 6C e D). Não detectamos a expressão gênica de nenhum componente mitocondrial em hADSC tratadas com PE 0,5%. A este respeito, a falha na detecção da expressão dos genes constitutivos indica que os dados de expressão gênica do grupo de hADSC tratadas com PE 0,5% não são confiáveis e precisam ser reanalisados.

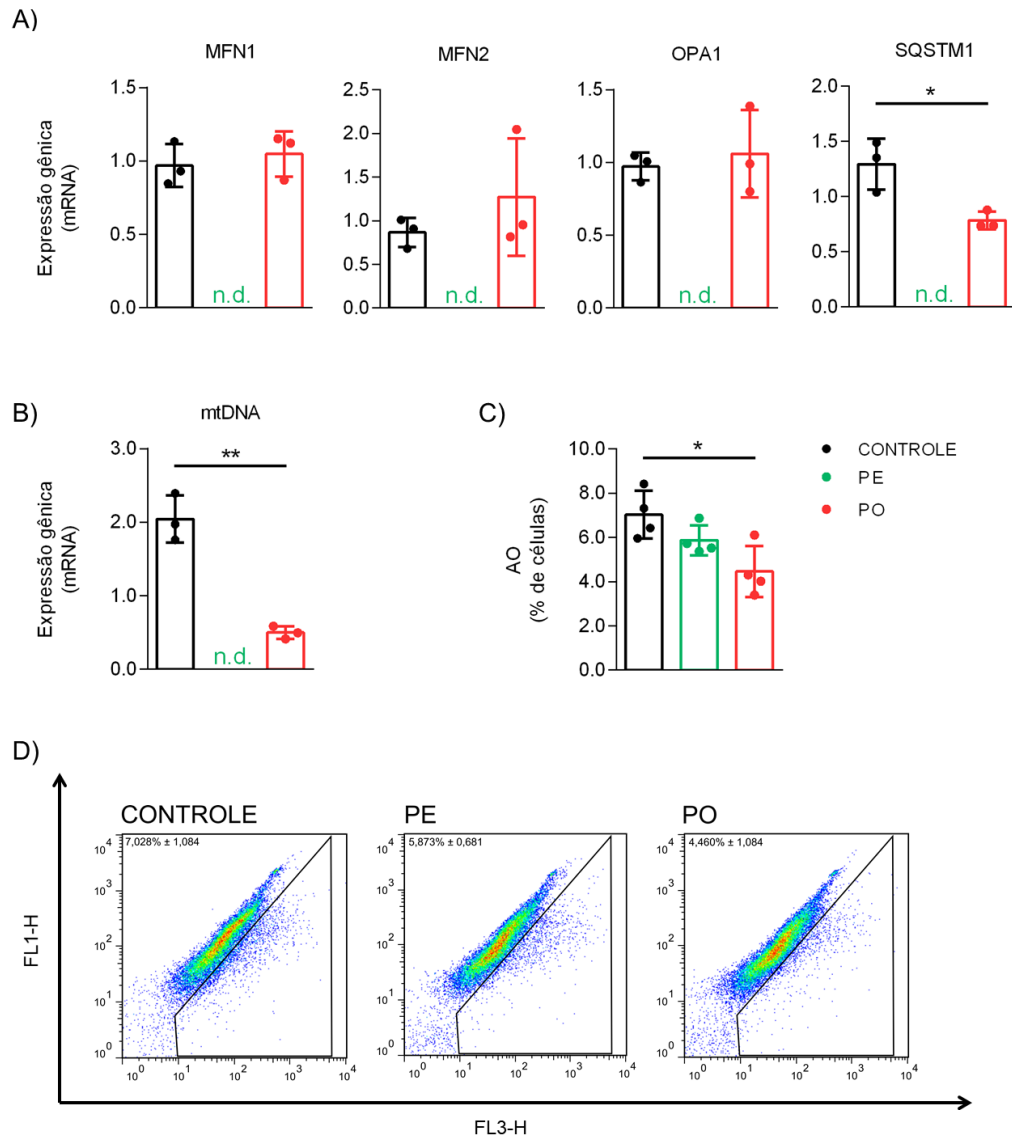


Figura 6. Diminuição do conteúdo mitocondrial e comprometimento da autofagia. As hADSC foram tratadas por 10 dias com plasma de indivíduos eutróficos, obesos ou FBS. **A)** Expressão de genes envolvidos no processo de fusão mitocondrial *MFN1*, *MFN2*, *OPA1* e *SQSTM1* (*P62*). **B)** Houve uma diminuição da expressão do gene mitocondrial *MT-ND1* em relação ao gene nuclear *HPRT1*, indicando que o mecanismo de biogênese mitocondrial pode estar afetado em hADSC expostas ao ambiente obesogênico. **C)** Houve diminuição da atividade autofágica após o tratamento com plasma de portadores de obesidade, após análise por citometria de fluxo avaliando a marcação de compartimentos celulares ácidos. **D)** Imagens representativas da população de células após 10 dias de tratamento, adquiridas por citometria de fluxo em relação à atividade autofágica. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**), após o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey (laranja de acridina) ou teste t não pareado (expressão gênica), com intervalo de confiança de 95%. Abreviações: MFN1: Mitofusina 1; MFN2: Mitofusina 2; OPA1: Atrofia Óptica 1; SQSTM1: Sesquetossomo 1; mtDNA: DNA mitocondrial; ND1: NADH desidrogenase mitocondrial; HPRT1: Fosforibosiltransferase Hipoxantina 1; AO: Laranja de acridina; MF: Média da intensidade de fluorescência; PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura; n.d.: não detectado.

II.3.3.8 Conteúdo de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mitocondrial não é alterado pelo tratamento com plasma

Uma vez que o tratamento PO 0,5% induziu alterações na dinâmica mitocondrial, afetando o potencial de membrana mitocondrial síntese *de novo* de mitocôndrias, investigamos se os tratamentos poderiam induzir um aumento na produção de ROS causando um desequilíbrio oxidativo. Assim, após 10 dias de tratamento, analisamos o conteúdo de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial. Não observamos diferença no conteúdo ($p = 0,7621$) (Figura 7A) nem na porcentagem de células positivas expressando $O_2^{\cdot-}$ ($p = 0,7621$) (ANOVA de uma via, IC95%) (Figura 7B) entre o grupo controle e os grupos tratados, indicando que a perda de função mitocondrial não está associada ao aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial.

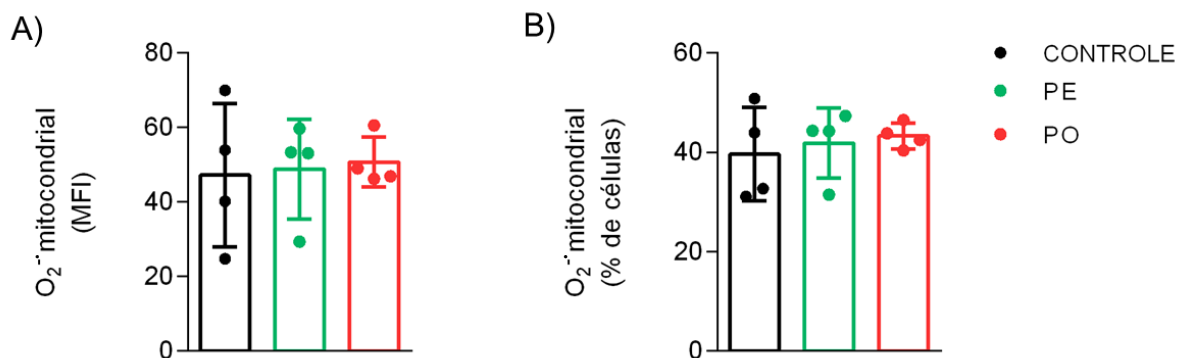


Figura 7. Conteúdo de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot-}$) não é alterado pelo tratamento com plasma. **A)** Não observamos diferença no conteúdo. **B)** nem na porcentagem de células expressando o ânion $O_2^{\cdot-}$ entre os três grupos estudados. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). Abreviações: MFI: Média da intensidade de fluorescência; $O_2^{\cdot-}$: superóxido; PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura.

II.3.3.9 Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz acúmulo de gotas lipídicas

Uma vez que o plasma é composto por fatores que podem ser importantes para a diferenciação de células precursoras de adipócitos (como hormônio do crescimento, insulina e outros fatores que promovem a diferenciação adipogênica), avaliamos a capacidade de diferenciação das hADSC em pré-adipócitos em resposta aos tratamentos, caracterizada pelo acúmulo de gotículas lipídicas. Após 10 dias de tratamento, observamos um aumento do acúmulo de gotas no grupo tratado com PO 0,5% em relação ao grupo controle ($p < 0,001$, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, 95%), mas não no tratamento com PE 0,5% (Figura 8).

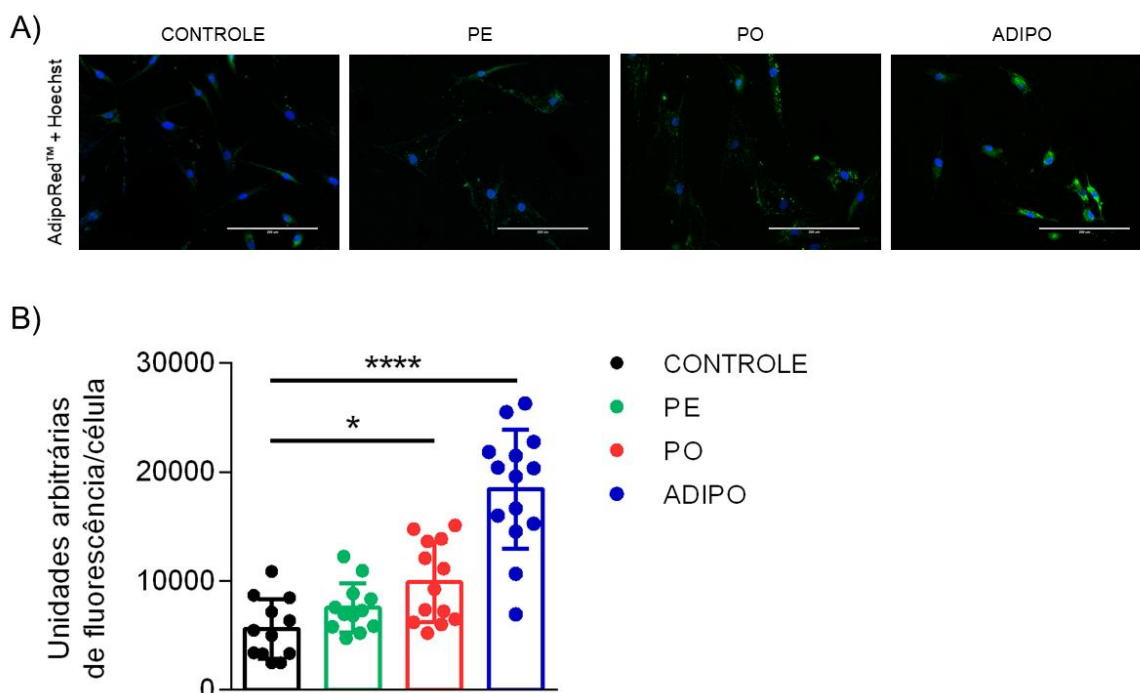


Figura 8. Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz acúmulo de gotas lipídicas. **A)** Imagens representativas após 10 dias de tratamento, adquiridas por microscopia de fluorescência. **B)** As análises por imagem demonstraram que houve um aumento do acúmulo de gotas lipídicas de hADSC expostas ao ambiente obesogênico por 10 dias comparadas ao grupo controle. Incluímos um grupo composto por hADSC induzidas à diferenciação adipogênica como controle positivo do experimento (ADIPO). Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,0001$ (****), após o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Abreviações: PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura; ADIPO: hADSC induzidas a diferenciação adipogênica por 10 dias.

II.3.3.10 Tratamento com plasma de obesos aumenta a expressão de TRF1

Uma vez que os dados obtidos no capítulo 2 dessa tese demonstraram que a proteína TRF1 é um importante fator que contribui para o fenótipo do envelhecimento no contexto da obesidade, avaliamos a expressão proteica de TRF1 em hADSC por citometria de fluxo, após o tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade ou eutróficos. A análise dos dados demonstrou que o tratamento PO 0,5% induziu um aumento na expressão da proteína TRF1 em relação à cultura controle (p

= 0,0082, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, IC95%) (Figura 9A). Ainda, o tratamento PO 0,5% aumentou a porcentagem de hADSC positivas para TRF1 em relação ao grupo controle ($p = 0,0371$, ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey, IC95%) (Figura 9B), sugerindo que o aumento da expressão da proteína TRF1 pode estar associada à indução do fenótipo senescente em hADSC.

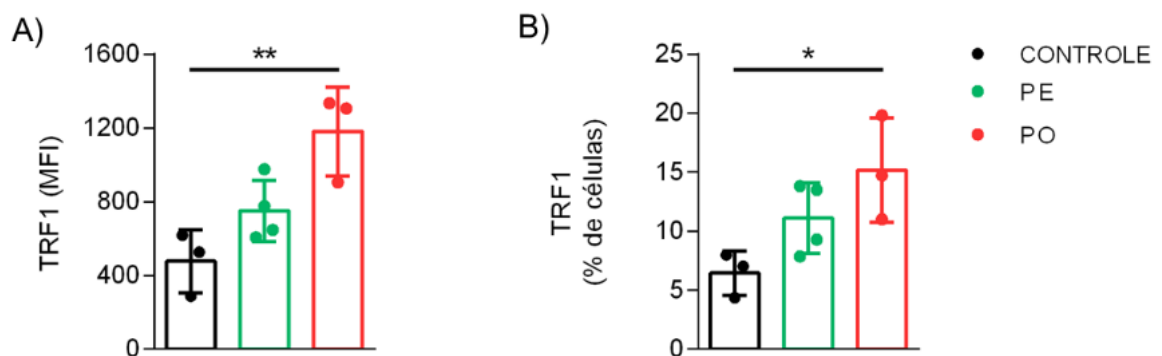


Figura 9. Tratamento com plasma de obesos aumenta a expressão de TRF1. **A)** Houve um aumento da expressão **B)** e na porcentagem de hADSC positivas para TRF1 expostas ao tratamento com PO por 10 dias, em relação ao grupo controle. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**), após o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Abreviações: MFI: Média da intensidade de fluorescência; PE: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos eutróficos diluído no meio de cultura; PO: 0,5% do *pool* de plasma de indivíduos portadores de obesidade diluído no meio de cultura; TRF1: Fator de Ligação de Repetição Telomérica 1.

II.3.4 Conclusões parciais

1. O tratamento com baixas concentrações de plasma (0,5%) de indivíduos portadores de obesidade foi capaz de induzir características associadas ao fenótipo senescente em hADSC;
2. Houve diminuição do potencial de membrana mitocondrial sem aumento da expressão de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial nas hADSC em resposta ao tratamento com plasma de indivíduos obesos;
3. Houve indícios de uma possível diminuição da sinalização de biogênese *de novo* de mitocôndrias e comprometimento dos mecanismos de autofagia nas hADSC expostas ao tratamento com plasma de indivíduos obesos;
4. O tratamento com plasma de obesos induziu acúmulo de gotas lipídicas de hADSC, característica associada à diferenciação de hADSC para o perfil de pré-adipócito;
5. A expressão de TRF1 aumentou nas hADSC tratadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade.

PARTE III

III.1 DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo que pode ser definido como o declínio das funções biológicas relacionadas com o tempo de vida. É acompanhado por uma série de mudanças fisiológicas e celulares, incluindo um estado de inflamação crônica, alteração na comunicação celular, disfunção mitocondrial, declínio da homeostase tecidual e deterioração das funções metabólicas. Além disso, os mecanismos de reparo tornam-se menos eficazes, levando ao acúmulo de células não funcionais que comprometem a função e induzem acúmulo de dano tecidual (Singer 2016). Embora não seja considerado uma doença, a aceleração das manifestações fenotípicas do envelhecimento pode aumentar a vulnerabilidade a diversas doenças, de forma que é considerado o principal fator de risco para a maioria das condições patológicas letais. Doenças relacionadas à aceleração do envelhecimento são caracterizadas por manifestarem um conjunto desses marcadores, que geralmente estão associados a um ambiente oxidativo e pró-inflamatório que levam ao declínio da função do sistema imune e favorecem a progressão da doença (Ovadya e Krizhanovsky 2014).

A obesidade é uma condição que compartilha características de doenças relacionadas à idade, uma vez que está relacionada a um estado inflamatório crônico de baixo grau (*inflammaging*), que pode contribuir para o desenvolvimento de síndrome metabólica e resistência insulínica (Franceschi et al. 2018). A etiologia da obesidade é complexa, e uma série de fatores estão envolvidos no estabelecimento e progressão da doença. Além do estilo de vida relacionado ao aumento da morbidade, existem fatores genéticos, neuroendócrinos, metabólicos, imunológicos e ambientais (Murdolo et al. 2013, Abdelaal et al. 2017). Adicionalmente, a obesidade é uma

condição de saúde que está associada à ocorrência de diferentes disfunções metabólicas, como diabetes tipo 2, síndrome metabólica, dislipidemia, resistência insulínica, hipertensão sistêmica, entre outras (Iglay et al. 2016, Jayanthi et al. 2017), que podem contribuir para o estabelecimento do desequilíbrio pró-inflamatório e pró-oxidativo e induzir a progressão da doença (Marseglia et al. 2015). Reforçando esse fato, estudos publicados também relacionam as comorbidades supracitadas com o encurtamento de telômeros e com a indução do fenótipo senescente, característicos do envelhecimento (Aulinas et al. 2015, Strazhesko et al. 2015, Bonfigli et al. 2016).

A respeito disso, diversos autores têm dedicado seus esforços na busca de estratégias que auxiliem no descobrimento das causas biológicas e os tecidos que estejam envolvidos no gatilho do processo de envelhecimento. Dessa forma, trabalhos que tenham como foco elucidar mecanismos moleculares e celulares que contribuem para o estabelecimento e a progressão do fenótipo continuam sendo cada vez mais pertinentes. Seguindo nessa linha, doenças relacionadas à aceleração das manifestações fenotípicas do envelhecimento são uma alternativa interessante na busca de reguladores-chave, no contexto dessas patologias.

Uma vez que a obesidade é uma desordem complexa que está associada a um estado de inflamação crônica, estudos que tenham como abordagem identificar os mecanismos celulares relacionados ao início da doença e o impacto na resposta imune sistêmica, surgem como abordagens interessantes. Nesse sentido, a fim de investigar mecanismos relacionados ao envelhecimento, bem como alterações metabólicas envolvidas na indução e progressão do fenótipo senescente, no contexto da obesidade, avaliamos modelos celulares *in vitro*, em dois tipos celulares associados a tecidos diferentes.

A fim de estudar o impacto da obesidade como uma doença inflamatória crônica que progride comprometendo o organismo de maneira sistêmica, avaliamos a homeostase do complexo telomérico de células do sistema imune periférico e seu perfil oxidativo, o qual pode ser condicionado pelo plasma de indivíduos portadores de obesidade. Os dados obtidos nesse trabalho permitiram não só confirmar a hipótese de que a obesidade é uma doença relacionada à aceleração do envelhecimento, mas também postular que a proteína TRF1, um importante componente do complexo telomérico, contribui para o fenótipo do envelhecimento, no contexto da obesidade. Além disso, o perfil pró-oxidativo observado no plasma desses indivíduos (Grun et al. 2018) confirmam os dados da literatura (Kocak et al. 2007, Furukawa et al. 2017), de modo que surgiram como uma importante estratégia para estudar a indução do fenótipo senescente em células residentes dos compartimentos tronco do tecido adiposo.

Nosso grupo de pesquisa tem focado em estratégias relacionadas à mecanismos envolvidos no processo de indução da imunossenescência. Recentemente, demonstramos através de um modelo de cultura celular, que a inflamação sistêmica associada à obesidade é suficiente para desencadear alterações relacionadas ao processo de imunossenescência em cultura primária de células do sistema imune (Parisi et al. 2017). Nesse sentido, como sequência dos objetivos projetados nessa tese, avaliamos o impacto do ambiente pró-oxidante e pró-inflamatório no metabolismo celular, capaz de desencadear a indução do fenótipo senescente em hADSC, através de um modelo de exposição crônica ao ambiente obesogênico durante a expansão dessas células em cultura celular *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dessa tese, podemos sugerir que a obesidade é uma doença que está relacionada ao envelhecimento, e que o ambiente inflamatório característico da obesidade não só afeta o organismo de maneira sistêmica, como também pode afetar a função de células responsáveis pelo remodelamento do tecido adiposo através da indução do fenótipo senescente associado à disfunção mitocondrial (Figura 1).

Durante a progressão da obesidade há o aumento da infiltração de células do sistema imune e a secreção de citocinas no tecido adiposo, promovendo um *milieu* inflamatório crônico (Bastard et al. 2006, Apostolopoulos et al. 2016). De fato, o tecido adiposo de indivíduos portadores de obesidade está associado ao recrutamento de células do sistema imune inato e adaptativo (Lackey e Olefsky 2016). Essas células respondem ao estresse celular liberando quimiocinas e adipocinas, as quais iniciam uma resposta inflamatória através do recrutamento de mais células imunes periféricas, a fim de permitir a expansão de adipócitos em resposta à necessidade de compartimentos maiores para o armazenamento lipídico (Reilly e Saltiel 2017).

Enquanto os adipócitos são a principal fonte das adipocinas leptina e adiponectina, as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são secretadas majoritariamente por células que constituem a SVF, como as hADSC e os pré-adipócitos (Siklova-Vitkova et al. 2012). Por sua vez, o TNF- α estimula a secreção de IL-6, IL-8 e a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (CCL2) em hADSC (Lee et al. 2010). Assim, após serem expostas ao microambiente inflamatório, as hADCS participam ativamente da resposta imune induzindo um aumento na secreção de

citocinas pró-inflamatórias, alterando a imunomodulação tecidual durante a progressão da obesidade (Shoshani e Zipori 2015, Silva et al. 2015).

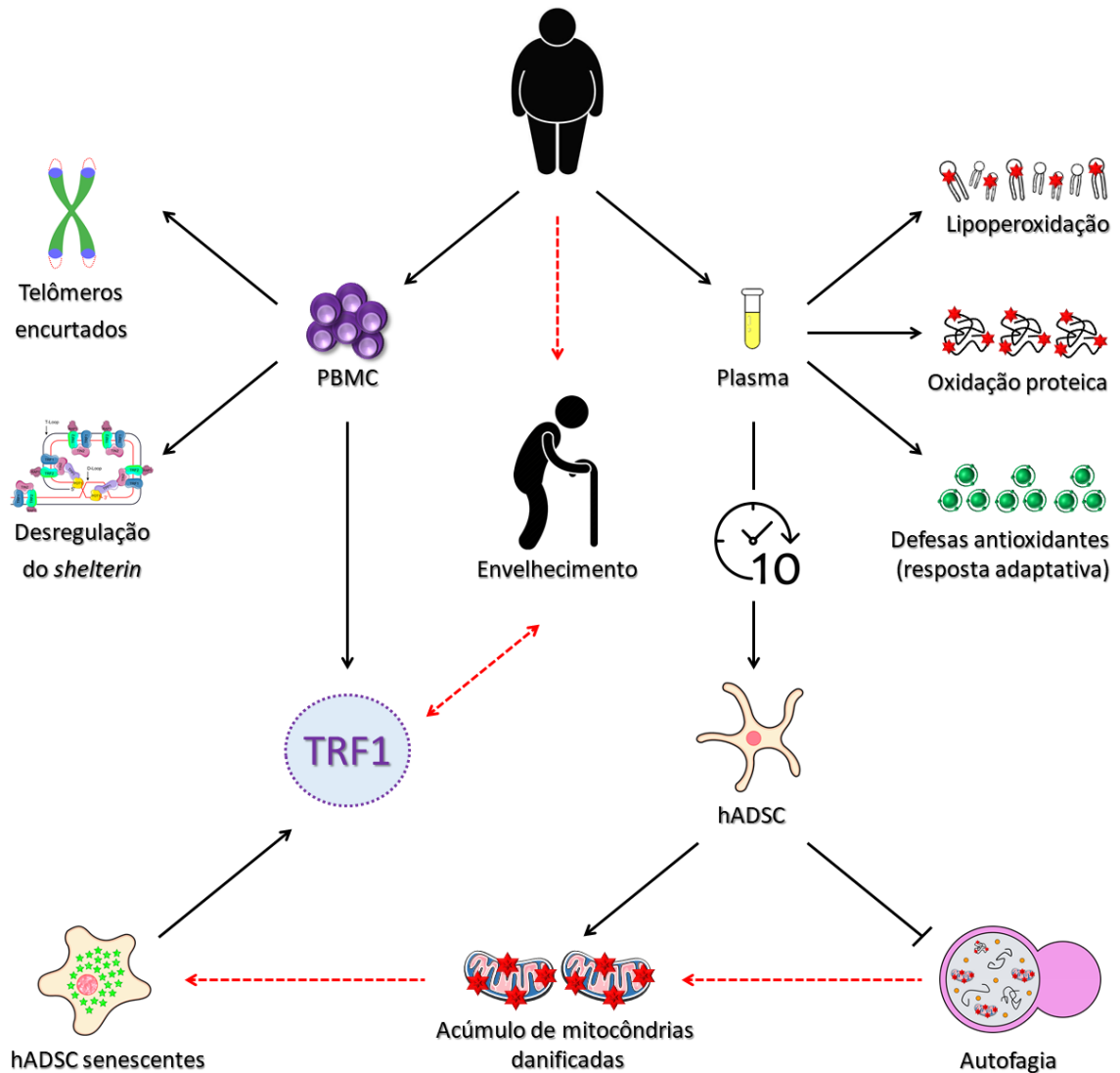


Figura 1. Visão geral dos resultados obtidos na tese. O impacto da obesidade pode ser observado em nível sistêmico através do comprometimento da homeostase telomérica em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos portadores de obesidade pelo encurtamento acelerado de telômeros e a desregulação das proteínas que compõem o complexo *shelterin*. Além disso, observamos os efeitos da obesidade no tecido adiposo (hADSC) através da incubação do plasma de indivíduos com obesidade, que foi capaz de induzir o fenótipo senescente em hADSC após exposição por 10 dias *in vitro*. O aumento da atividade da enzima SA-β-gal e o aumento da expressão de *CDKN1A* (*P21*) sugerem um gatilho para o início do estabelecimento do fenótipo senescente em hADSC. Ainda, o aumento da expressão de TRF1 tanto em PBMC com telômeros encurtados quanto em hADSC senescentes sugere um importante papel da proteína do complexo *shelterin* na indução da senescência celular. O acúmulo de mitocôndrias disfuncionais pode ser consequência da diminuição da autofagia em hADSC senescentes, de modo que mitocôndrias danificadas poderiam contribuir para o fenótipo. Setas pretas indicam dados obtidos durante a execução da tese, enquanto as setas vermelhas indicam possíveis relações.

A expansão tecidual também induz alterações na composição, estrutura e função do tecido. Dessa maneira, as hADSC também possuem um papel importante no remodelamento tecidual. Há evidências de que a capacidade multipotente de hADSC está comprometida na obesidade. De acordo com isso, e corroborando com nossos dados relacionados ao acúmulo de gotas lipídicas obtidos no capítulo 3, estudos demonstram que hADSC de indivíduos portadores de obesidade apresentam uma diminuição na expressão de genes marcadores de pluripotência, como fator de transcrição 4 ligante de octâmero (*OCT4*) e fator de transcrição SRY-box 15 (*SOX15*) (Patel et al. 2016, Petrangeli et al. 2016) e de genes marcadores de multipotência envolvidos no desenvolvimento embrionário, como a proteína *homeobox 10* (*HOXC10*) e o fator de transcrição T-box 15 (*TBX15*), além de um aumento na expressão de genes envolvidos na adipogênese e na inflamação, como IL-1 β , IL-8 e CCL2 (Onate et al. 2013). Nesse contexto, já foi demonstrado que a excessiva perda de peso de indivíduos portadores de obesidade está relacionada com a atenuação do estado pró-inflamatório no tecido adiposo subcutâneo (Moschen et al. 2010).

Os resultados obtidos no capítulo 2 demonstraram um aumento da expressão do gene *IL-1 β* e *TNF- α* em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, sugerindo que os efeitos da doença parecem não ser restritos ao tecido de origem, mas que também poderia contribuir para o estabelecimento de um ambiente inflamatório sistêmico, além de, potencialmente, estar associado à inibição da transdução de sinais da insulina durante a expansão do tecido adiposo (Lagathu et al. 2006, Bing 2015).

O recrutamento de células do sistema imune e o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao acúmulo de dano tecidual, presente na obesidade, promovem um *milieu* inflamatório que eventualmente leva a danos

celulares persistentes, contribuindo para o comprometimento da função tecidual e acelerando o processo de envelhecimento. Tanto a progressão do envelhecimento como a involução do timo resultam na diminuição da população de células T virgens circulantes e o subsequente aumento da taxa de diferenciação celular (Xia et al. 2016). Assim, ambas características, bem como o encurtamento de telômeros, são consideradas biomarcadores de envelhecimento de células T em humanos (Zubakov et al. 2016). De acordo com esses dados, no estudo publicado por Jongbloed e colaboradores, além do encurtamento de telômeros associado à obesidade, os autores ainda observaram um aumento na taxa de diferenciação de células T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes (Jongbloed et al. 2019).

Assim, esse estado de *para-inflamação*, característico da obesidade, pode induzir a proliferação de precursores hematopoiéticos na medula óssea e a expansão e proliferação de leucócitos em tecidos periféricos, induzindo características do fenótipo senescente, como o aumento na secreção de citocinas inflamatórias e o encurtamento de telômeros. De acordo com essa hipótese, dados recentes do nosso grupo demonstraram que o plasma de pacientes portadores de obesidade é capaz de induzir o fenótipo imunossenesciente em PBMC de doador saudável (Parisi et al. 2017).

Dentre os fatores que contribuem para a aceleração do envelhecimento, estudos têm destacado a relação essencial entre o declínio gradual da função mitocondrial com a progressão da idade, levando ao acúmulo de danos oxidativos que comprometem a função metabólica (López-Otín et al. 2013, Finkel 2015). Além da diminuição da capacidade respiratória e a perda da função das enzimas mitocondriais, o aumento de mutações no mtDNA pode resultar em uma variedade de doenças,

incluindo miopatias, neuropatias, diabetes, e sinais de envelhecimento prematuro, contribuindo para a redução da expectativa de vida (Lee e Wei 2012).

A função mitocondrial adequada é necessária para sustentar a demanda energética durante a proliferação celular de hADSC (Ito e Suda 2014). Por outro lado, a literatura tem demonstrado que a função e o conteúdo mitocondrial de hADSC estão prejudicados na obesidade, promovendo mudanças fisiológicas no metabolismo energético celular (Pérez et al. 2015). Assim, um aumento no desequilíbrio oxidativo induzido pelo acúmulo de mitocôndrias danificadas associadas a um estado de inflamação crônica poderia contribuir para a aceleração do encurtamento de telômeros e à indução do fenótipo senescente, como o observado na obesidade (Salvestrini et al. 2019).

Foi demonstrado que a biogênese e a capacidade oxidativa de mitocôndrias do tecido adiposo subcutâneo de indivíduos obesos são prejudicadas pelo estresse metabólico promovido pelo ambiente inflamatório característico da obesidade (Heinonen et al. 2015). Em consequência disso, a fosforilação oxidativa em hADSC poderia estar comprometida, causando a disfunção no metabolismo energético. De fato, nossos resultados apontam uma diminuição na biogênese de mitocôndrias e um aumento na despolarização das membranas mitocondriais em hADSC expostas ao ambiente obesogênico. Esses dados sugerem que o ambiente pró-oxidante induzido pelo plasma de indivíduos obesos seria capaz de modular e comprometer a função mitocondrial, afetando a maquinaria bioenergética através da diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias.

Outro fator importante relacionado ao metabolismo mitocondrial e o envelhecimento de células tronco é a razão $NAD^+/NADH$. Tem sido relatado que

durante a progressão do envelhecimento os níveis de NAD⁺ diminuem nos tecidos (Yoshino et al. 2011, Mouchiroud et al. 2013). Ainda, a suplementação de NAD⁺ pode recuperar algumas características de células previamente induzidas à senescência pela depleção de NAD⁺. Esses efeitos podem ser, pelo menos em parte, mediados pelas sirtuínas, uma família de enzimas deacetilases dependentes de NAD⁺. Nesse sentido, Brown e colaboradores demonstraram que os níveis de Sirtuína 3 diminuem em mitocôndrias de células tronco hematopoiéticas (HSC) envelhecidas, e que sua superexpressão está relacionada ao aumento da capacidade regenerativa (Brown et al. 2013).

A senescência celular foi originalmente descrita como uma resposta do organismo ao encurtamento de telômeros causado por exaustão replicativa; contudo, tem sido descrito que diversos indutores de estresse, incluindo dano ao DNA, disfunção mitocondrial e indução por oncogenes também são capazes de ativar a senescência. Além da parada permanente do ciclo celular, as células em estado senescente manifestam características fenotípicas importantes, como um aumento do tamanho celular e uma morfologia achatada. Além disso, as células também exibem danos que promovem uma alteração na estrutura da cromatina (SAHF) e o estabelecimento de um perfil secretor ou secretoma que compõem o SASP, o qual contribui para a manutenção do fenótipo. Dessa maneira, o SASP é capaz de modular não somente o fenótipo senescente de forma autócrina, mas também influenciar no metabolismo de células próximas através da modulação do microambiente tecidual de maneira parácrina (Andriani et al. 2016, Strzyz 2016, Hernandez-Segura et al. 2018, Herranz e Gil 2018).

A senescência é uma resposta adaptativa que funciona de maneira dinâmica e heterogênea em alguns tecidos. De maneira geral, após a ativação dos genes que induzem a parada irreversível do ciclo celular, como *CDKN1A* e *CDKN2A*, a progressão do fenótipo acontece pelo estabelecimento do SASP, caracterizado pela secreção de citocinas e quimiocinas que perpetuam o fenótipo. Nesse ponto, se as células residentes evoluem e sobrevivem ao estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório, elas passam a entrar em um estágio de senescência tardia, caracterizado por um aumento do *fitness* adaptativo. De acordo com a teoria da progressão do fenótipo senescente, a heterogeneidade celular observada nos diferentes tecidos pode ser explicada. De fato, a resposta aguda parece estar relacionada com um reparo rápido e eficaz em tecidos senescentes, contribuindo para a homeostase tecidual. Já um estado senescente crônico pode resultar de danos persistentes e é frequentemente associado ao acúmulo de dano e à deterioração das funções celulares, característicos do envelhecimento (Van Deursen 2014, Herranz e Gil 2018).

A parada do ciclo celular ocorre pela ativação das vias metabólicas TP53/P21 e P16/Rb (Kulaberoglu et al. 2016). A ativação de TP53 induz a transcrição de *CDKN1A*, que por sua vez bloqueia a atividade de CDK2, resultando na hipofosforilação de Rb e na parada do ciclo. Dessa forma, a sinalização de TP53 pode modular a senescência em vários tipos celulares (Johmura e Nakanishi 2016, Li et al. 2016, Tonnessen-Murray et al. 2017). Entretanto, alguns eventos estressores podem desencadear uma parada transiente do ciclo celular, de modo que a indução de TP53 seja capaz de ativar os processos de reparo do DNA, e permitindo que célula possa retomar o ciclo replicativo. Após a resolução do estresse, as células podem retomar o ciclo (Kulaberoglu et al. 2016). Já a modulação de eventos de estresse persistentes

podem ativar o *CDKN2A* (P16), que por sua vez inibe CDK4 e CDK6, de modo que induz uma parada de longa duração (Kuilman et al. 2010, Liu et al. 2019). Estudos sugerem que o papel de *CDKN1A* (P21) pode estar relacionado ao início da senescência, enquanto *CDKN2A* (P16) é responsável por manter a parada do ciclo celular de forma permanente. De fato, embora a indução de *CDKN1A* (P21) seja importante para o estabelecimento das manifestações fenotípicas da senescência, sua expressão não persiste com a progressão dos estágios subsequentes. Nesse âmbito, a regulação positiva de *CDKN1A* (P21) atua como um gatilho da senescência, principalmente em células embrionárias (Sharpless e Sherr 2015).

Interessantemente, nossos dados indicam um aumento expressivo na atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência em hADSC expostas ao plasma de indivíduos portadores de obesidade. As hADSC mudaram seu fenótipo ao final do tratamento, adquirindo um aumento do tamanho e uma morfologia achatada, de modo que a observação no microscópio ficou restrita a um plano focal curto. Além disso, o aumento da expressão do gene *CDKN1A* (P21) sugere o início do estabelecimento do fenótipo senescente, uma vez que não observamos a expressão gênica de *CDKN2A* (P16). Ainda, esses dados reforçam o fato de que em 10 dias não observamos diferenças no tempo de duplicação nas hADSC, de modo que o aumento do tempo de exposição em cultura celular poderia refletir no declínio da capacidade proliferativa, a qual não foi evidenciada em nosso desenho experimental.

A senescência é um mecanismo que pode ser ativado de forma fisiológica durante o desenvolvimento, além de ser necessária para a remodelação dos tecidos. Nesse âmbito, a indução transitória de senescência é um importante mecanismo durante a cicatrização e remoção de células danificadas, contribuindo para a

recuperação tecidual (Munoz-Espin et al. 2013, Storer e Keyes 2014). De fato, a senescência também pode ser estudada como uma resposta ao estresse, de modo que seja um importante mecanismo que evite o desenvolvimento de doenças malignas ao limitar a replicação de células potencialmente neoplásicas (Collado e Serrano 2010, Hinds e Pietruska 2017).

Por outro lado, a literatura demonstra que o acúmulo de células senescentes pode influenciar no desenvolvimento de doenças e acelerar o processo de envelhecimento através do comprometimento da homeostase tecidual (Munoz-Espin e Serrano 2014). Durante o envelhecimento, altos níveis na indução de senescência em células tronco e progenitoras está relacionada à diminuição da homeostase tecidual, comprometendo a capacidade de reparo e regeneração tecidual.

Senescência e apoptose são destinos celulares alternativos que podem ser desencadeados por mecanismos de estresse semelhantes. Embora estudos demonstrem que células senescentes são resistentes à apoptose, a regulação das vias metabólicas que auxiliem no entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na ativação de um destino em detrimento do outro ainda são escassos. Entretanto, estudos recentes sugerem que a resistência de células senescentes à apoptose pode ser resultado da regulação positiva das proteínas da família BCL-2, uma vez que a inibição das proteínas pertencentes a família BCL-2 é capaz de induzir apoptose nas células senescentes (Yosef et al. 2016, Zhu et al. 2016). Em consonância com esses dados, nossos resultados sugerem que o ambiente obesogênico é capaz de modular hADSC para um fenótipo senescente e evitar a morte celular como destino alternativo, através da inibição da via de apoptose mediada por caspases.

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que a disfunção mitocondrial é capaz de induzir e manter o fenótipo senescente em diferentes organismos através de um secretoma independente de IL-1 β observado no SASP, composto por IL-10, TNF α , CCL27. Ainda, embora seja observado um declínio da função mitocondrial, a progressão do fenótipo parece ser independente do aumento de produção de ROS (Correia-Melo et al. 2016, Wiley et al. 2016). De acordo com esses dados, além de ser um importante marcador do processo de envelhecimento, a disfunção mitocondrial também é capaz de induzir senescência através de um mecanismo alternativo, embora compartilhe características fundamentais relacionadas à senescência clássica promovida por SASP (Wiley et al. 2016).

A autofagia é um mecanismo de degradação evolutivamente conservado em organismos eucariotos. Foi considerado pela primeira vez um sistema de degradação de proteínas e organelas não seletivo, com a finalidade de reciclar nutrientes celulares e gerar energia (Yang e Klionsky 2010). O papel do metabolismo mitocondrial e da autofagia na senescência é complexo e controverso (Kwon et al. 2017). Por um lado, a autofagia foi um processo descrito como um mecanismo adaptativo que tem como objetivo suprimir a ativação de senescência induzida por oncogene. Nesse sentido, foi demonstrado que um tipo especializado de autofagia, denominado compartimento de acoplamento espacial de autofagia associado ao TOR (TASCC), contribui, de fato, para a síntese proteica de alguns elementos do SASP através da ativação da via mTOR, estimulando a síntese de IL-6 e IL-8, perpetuando a senescência (Narita et al. 2011).

Por outro lado, alguns trabalhos têm demonstrado que a autofagia pode estar relacionada a um mecanismo anti-senescência. De acordo com isso, a inibição da autofagia através do nocaute das proteínas ATG7 ou ATG5 induz senescência em fibroblastos humanos primários, principalmente por meio do acúmulo de mitocôndrias danificadas e elevados níveis de ROS (Kang et al. 2011). O mecanismo de autofagia parece ser dependente dos níveis de estresse celular e a capacidade adaptativa que o organismo possui para combater o acúmulo de danos. Uma vez que um ambiente oxidativo pode induzir autofagia na tentativa de sobrevivência celular, o acúmulo de estresse pode comprometer a sinalização de autofagia. Desse acordo com isso, demonstrou-se que níveis elevados de estresse relacionados ao acúmulo de mitocôndrias danificadas e uma produção aumentada de ROS podem comprometer a sinalização autofágica, causando eventualmente senescência celular (Tai et al. 2017).

Nesse sentido, alguns estudos sugerem que a inibição da autofagia facilita a progressão da senescência (Wang et al. 2012, Kang et al. 2015, Lee et al. 2018). De acordo com isso, Kang e colaboradores demonstraram que a autofagia está inibida durante a indução de senescência pela diminuição da interação entre GATA4 e P62, um adaptador de membrana essencial para a degradação autofágica. A estabilização de GATA4, por sua vez, ativa NF- κ B através de IL-1 α , promovendo senescência através do SASP (Kang et al. 2015). Resultados semelhantes foram observados em células tronco mesenquimais humanas induzidas à senescência de forma parácrina, mediado principalmente por CCL2 através da ativação de NF- κ B (Lee et al. 2018). Em consonância com esses achados, nossos dados sugerem uma diminuição da autofagia em hADSC senescentes expostas ao ambiente obesogênico após 10 dias. Ademais, ainda observamos uma diminuição da expressão gênica de *SQSTM1* (P62).

Esses resultados podem indicar que o início do fenótipo senescente pode estar relacionado à ativação das vias de reparo em resposta ao acúmulo de dano ao DNA. A ativação de ATM/ATR alivia a inibição de TP53, que por sua vez ativa CDKN1A induzindo o gatilho para o estabelecimento do fenótipo senescente, como a subsequente parada do ciclo celular. O sinal de senescência poderia contribuir para o bloqueio da degradação autofágica de GATA4 dependente de P62, resultando na ativação de NF- κ B e na indução de SASP, perpetuando a senescência para um estado de inflamação crônica.

Corroborando com esses dados, foi demonstrado que a falha no processo autofágico em células tronco musculares fisiologicamente envelhecidas pode ser a causa para o início de senescência mediado por disfunção mitocondrial e a perda da proteostase. Interessantemente, danos genéticos relacionados ao processo de autofagia também foram capazes de induzir senescência em células jovens, de modo que a reativação da maquinaria autofágica foi capaz de reverter a senescência, restaurando as funções regenerativas (García-Prat et al. 2016). Esses dados sugerem uma importante relação entre a manutenção da capacidade tronco controlada pelo processo autofágico.

Além disso, as células senescentes exibem níveis reduzidos de mitofagia, resultando no acúmulo de mitocôndrias danificadas e uma rede mitocondrial comprometida, a qual poderia contribuir para a disfunção metabólica durante a progressão do envelhecimento. Nesse sentido, um estudo demonstrou que a depleção de mitocôndrias foi capaz de inibir a progressão do fenótipo senescente. Interessantemente, células senescentes sem mitocôndrias exibiram níveis mais altos de ATP devido ao desvio da produção de energia para a via glicolítica (Correia-Melo

et al. 2016). Esses dados reforçam a teoria de que o mecanismo de senescência pode ser regulado pelo *status* do metabolismo oxidativo mitocondrial, independentemente da produção de energia.

Por fim, nossos dados obtidos no capítulo 3 relacionados ao aumento da expressão da proteína TRF1 no contexto da senescência, estão de acordo com os resultados publicados no capítulo 2, demonstrando um aumento da expressão de TRF1 em PBMC de indivíduos portadores de obesidade (Grun et al. 2018). Dessa forma, o acúmulo de dano relacionado ao início do processo de senescência pode induzir não só o encurtamento de telômeros, mas também a perda da homeostase das proteínas que compõem o complexo *shelterin*, de modo que a TRF1 parece ter um papel de destaque. Esses achados corroboram a hipótese de que a proteína TRF1, regulador negativo do mecanismo de alongação dos telômeros, possui um papel importante na progressão do envelhecimento tanto a nível celular no tecido adiposo quanto a nível sistêmico, sugerindo que TRF1 poderia ser um importante ponto de conexão observado no nosso modelo de senescência no contexto da obesidade.

Por fim, a senescência é um mecanismo adaptativo complexo e heterogêneo. Nesse âmbito, trabalhos que se concentrem na regulação da indução do fenótipo senescente têm se destacado. Assim, o estudo dos mecanismos associados aos processos de indução e manutenção do estado senescente podem auxiliar no desenvolvimento de terapias senolíticas, de modo que podem apresentar uma importante estratégia no controle de patologias que estão associadas ao envelhecimento. Contudo, além dos potenciais efeitos colaterais, a avaliação dos compostos senolíticos ainda pode ser comprometida por limitações como a falta de biomarcadores de senescência e a grande heterogeneidade de fenótipos senescentes

nos diferentes tecidos. Assim, pesquisas que elucidem a regulação das vias metabólicas que desencadeiam e que mantêm o fenótipo senescente podem fornecer novos caminhos que auxiliem na identificação de biomarcadores e possíveis terapias combinadas para eliminar de forma acurada e específica células senescentes, sem afetar o microambiente tecidual.

III.2 CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados obtidos nesta tese sugerem que a obesidade é uma doença associada à aceleração do envelhecimento. O impacto da obesidade pôde ser observado em diferentes contextos celulares, tanto em nível sistêmico (PBMC) quanto a nível celular no tecido adiposo (hADSC). Além disso, o acúmulo de mitocôndrias danificadas, em decorrência da falha no processo autofágico, pode ser um possível mecanismo que contribui para o estabelecimento do fenótipo. Nossos dados também sugerem que a proteína TRF1 parece ter um importante papel na indução da senescência celular, no contexto da progressão do envelhecimento.

Por fim, os dados obtidos nesse trabalho estão em consonância com trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa e de diversos autores. Esses dados em conjunto reforçam a hipótese de que a obesidade está associada à processos celulares que podem induzir a ativação de respostas moleculares e desencadear, de forma precoce, mecanismos similares aos observados no envelhecimento fisiológico.

III.3 PERSPECTIVAS

1. Avaliar a regulação das vias CDKN1A (P21) e CDKN2A (P16) na progressão do fenótipo senescente após um período de exposição em cultura mais prolongado;
2. Avaliar o consumo de oxigênio e parâmetros relacionados à dinâmica mitocondrial pela técnica de respirometria de alta resolução;
3. Avaliar a secreção de citocinas anti e pró-inflamatórias no meio de cultura;
4. Avaliar a razão NAD⁺/NADH e os níveis de p-AMPK a fim de relacioná-los à senescência induzida por disfunção mitocondrial;
5. Avaliar a capacidade da diferenciação de hADSC em macrófagos (CD68⁺) em resposta ao ambiente obesogênico;
6. Avaliar o papel de TRF1 na regulação de mecanismos envolvidos durante a indução do fenótipo senescente, no contexto da obesidade;
7. Estabelecer e transpor o modelo MiDAS para outras linhagens e estudar o papel no desenvolvimento de outras doenças relacionadas ao envelhecimento precoce.

REFERÊNCIAS

- Abdelaal, M., C. W. le Roux and N. G. Docherty (2017). "Morbidity and mortality associated with obesity." Annals of translational medicine **5**(7).
- Adams, P. D. (2009). "Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence." Mol Cell **36**(1): 2-14.
- Aird, K. M., G. Zhang, H. Li, Z. Tu, B. G. Bitler, A. Garipov, H. Wu, Z. Wei, S. N. Wagner and M. Herlyn (2013). "Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence." Cell Rep **3**(4): 1252-1265.
- Albrecht, E., E. Sillanpää, S. Karrasch, A. C. Alves, V. Codd, I. Hovatta, J. L. Buxton, C. P. Nelson, L. Broer and S. Hägg (2014). "Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease." European Respiratory Journal **43**(4): 983-992.
- Andriani, G. A., V. P. Almeida, F. Faggioli, M. Mauro, W. L. Tsai, L. Santambrogio, A. Maslov, M. Gadina, J. Campisi and J. Vijg (2016). "Whole Chromosome Instability induces senescence and promotes SASP." Sci Rep **6**: 35218.
- Apostolopoulos, V., M. P. de Courten, L. Stojanovska, G. L. Blatch, K. Tangalakis and B. de Courten (2016). "The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity." Molecular nutrition & food research **60**(1): 43-57.
- Apovian, C. M. (2016). "Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden." Am J Manag Care **22**(7 Suppl): s176-185.
- Armanios, M. and E. H. Blackburn (2012). "The telomere syndromes." Nature Reviews Genetics **13**(10): 693.
- Ashar, F. N., Y. Zhang, R. J. Longchamps, J. Lane, A. Moes, M. L. Grove, J. C. Mychaleckyj, K. D. Taylor, J. Coresh and J. I. Rotter (2017). "Association of mitochondrial DNA copy number with cardiovascular disease." JAMA cardiology **2**(11): 1247-1255.
- Aulinas, A., M.-J. Ramirez, M.-J. Barahona, E. Valassi, E. Resmini, E. Mato, A. Santos, I. Crespo, O. Bell and J. Surralles (2015). "Dyslipidemia and chronic inflammation markers are correlated with telomere length shortening in Cushing's syndrome." PLoS One **10**(3): e0120185.
- Avram, A. S., M. M. Avram and W. D. James (2005). "Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue." J Am Acad Dermatol **53**(4): 671-683.

Bae, Y. S., H. Oh, S. G. Rhee and Y. Do Yoo (2011). "Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling." Mol Cells **32**(6): 491-509.

Bajek, A., N. Gurtowska, J. Olkowska, L. Kazmierski, M. Maj and T. Drewa (2016). "Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies." Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis **64**(6): 443-454.

Bastard, J. P., M. Maachi, C. Lagathu, M. J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau and B. Feve (2006). "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance." Eur Cytokine Netw **17**(1): 4-12.

Belsky, D. W., I. Shalev, M. R. Sears, R. J. Hancox, H. Lee Harrington, R. Houts, T. E. Moffitt, K. Sugden, B. Williams and R. Poulton (2014). "Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife?" Am J Respir Crit Care Med **190**(4): 384-391.

Bento, C. F., M. Renna, G. Ghislat, C. Puri, A. Ashkenazi, M. Vicinanza, F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2016). "Mammalian autophagy: how does it work?" Annu Rev Biochem **85**: 685-713.

Bing, C. (2015). "Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?" Adipocyte **4**(2): 149-152.

Bischof, G. N. and D. C. Park (2015). "Obesity and aging: Consequences for cognition, brain structure and brain function." Psychosomatic medicine **77**(6): 697.

Blackburn, E. H. (2001). "Switching and signaling at the telomere." Cell **106**(6): 661-673.

Blackburn, E. H., E. S. Epel and J. Lin (2015). "Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection." Science **350**(6265): 1193-1198.

Blackburn, E. H. and J. G. Gall (1978). "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena." Journal of molecular biology **120**(1): 33-53.

Bluher, M. (2009). "Adipose tissue dysfunction in obesity." Exp Clin Endocrinol Diabetes **117**(6): 241-250.

Bonfigli, A. R., L. Spazzafumo, F. Prattichizzo, M. Bonafè, E. Mensà, L. Micolucci, A. Giuliani, P. Fabbietti, R. Testa and M. Boemi (2016). "Leukocyte telomere length and mortality risk in patients with type 2 diabetes." Oncotarget **7**(32): 50835.

Bonomini, F., L. F. Rodella and R. Rezzani (2015). "Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress." Aging Dis **6**(2): 109.

Brown, K., S. Xie, X. Qiu, M. Mohrin, J. Shin, Y. Liu, D. Zhang, D. T. Scadden and D. Chen (2013). "SIRT3 reverses aging-associated degeneration." Cell Rep **3**(2): 319-327.

Bujak, A. L., J. D. Crane, J. S. Lally, R. J. Ford, S. J. Kang, I. A. Rebalka, A. E. Green, B. E. Kemp, T. J. Hawke and J. D. Schertzer (2015). "AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging." Cell Metab **21**(6): 883-890.

Butt, H., G. Atturu, N. London, R. Sayers and M. Bown (2010). "Telomere length dynamics in vascular disease: a review." European Journal of Vascular and Endovascular Surgery **40**(1): 17-26.

Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annual review of physiology **75**: 685-705.

Capel, F., V. Rimbart, D. Lioger, A. Diot, P. Rousset, P. P. Mirand, Y. Boirie, B. Morio and L. Mosoni (2005). "Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved." Mech Ageing Dev **126**(4): 505-511.

Caporarello, N., J. Meridew, D. Jones, Q. Tan, A. Haak, L. Manlove, Y. Prakash, D. Tschumperlin and G. Ligresti (2018). Loss of PGC1 α Leads to Mitochondrial Dysfunction and Contributes to Lung Fibroblast Activation. B28. CELL AND MATRIX MICROENVIRONMENTS MODULATE LUNG DISEASE, American Thoracic Society: A2910-A2910.

Choi, C. H. J. and P. Cohen (2017). "Adipose crosstalk with other cell types in health and disease." Experimental cell research **360**(1): 6-11.

Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nat Rev Cancer **10**(1): 51-57.

Coppé, J.-P., P.-Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annual Review of Pathological Mechanical Disease **5**: 99-118.

Cordani, M., M. Donadelli, R. Strippoli, A. V. Bazhin and M. Sánchez-Álvarez (2019). "Interplay between ROS and Autophagy in Cancer and Aging: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Approaches." Oxidative medicine and cellular longevity **2019**.

Correia-Melo, C., F. D. Marques, R. Anderson, G. Hewitt, R. Hewitt, J. Cole, B. M. Carroll, S. Miwa, J. Birch and A. Merz (2016). "Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype." EMBO J **35**(7): 724-742.

Cui, H., Y. Kong and H. Zhang (2012). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." Journal of signal transduction **2012**.

Davalli, P., T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola and D. D'Arca (2016). "ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases." Oxidative medicine and cellular longevity **2016**.

de Lange, T. (2009). "How telomeres solve the end-protection problem." Science **326**(5955): 948-952.

de Lange, T. (2015). "A loopy view of telomere evolution." Front Genet **6**: 321.

Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." Nat Protoc **4**(12): 1798-1806.

di Fagagna, F. d. A. (2008). "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response." Nature Reviews Cancer **8**(7): 512.

Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, P. G. Nuciforo, A. Bensimon and R. Maestro (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." Nature **444**(7119): 638.

Dikic, I. and Z. Elazar (2018). "Mechanism and medical implications of mammalian autophagy." Nature reviews Molecular cell biology **19**(6): 349.

Dominguez, L. J. and M. Barbagallo (2016). "The biology of the metabolic syndrome and aging." Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care **19**(1): 5-11.

Drolet, R., C. Richard, A. D. Sniderman, J. Mailloux, M. Fortier, C. Huot, C. Rheaume and A. Tchernof (2008). "Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women." Int J Obes (Lond) **32**(2): 283-291.

Dykstra, J. A., T. Facile, R. J. Patrick, K. R. Francis, S. Milanovich, J. M. Weimer and D. J. Kota (2017). "Concise Review: Fat and furious: Harnessing the full potential of adipose-derived stromal vascular fraction." Stem cells translational medicine **6**(4): 1096-1108.

Egan, E. D. and K. Collins (2012). "Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins." RNA **18**(10): 1747-1759.

Ellulu, M. S., H. Khaza'ai, A. Rahmat, I. Patimah and Y. Abed (2016). "Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults." Int J Cardiol **215**: 318-324.

Erdel, F., K. Kratz, S. Willcox, J. D. Griffith, E. C. Greene and T. de Lange (2017). "Telomere recognition and assembly mechanism of mammalian shelterin." Cell Rep **18**(1): 41-53.

Evan, G. I. and F. d. A. di Fagagna (2009). "Cellular senescence: hot or what?" Curr Opin Genet Dev **19**(1): 25-31.

Federico, A., E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G. N. Gallus and E. Radi (2012). "Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration." Journal of the neurological sciences **322**(1-2): 254-262.

Fernández-Sánchez, A., E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, Á. Morales-González, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sánchez-Rivera, C. Valadez-Vega and J. A. Morales-González (2011). "Inflammation, oxidative stress, and obesity." Int J Mol Sci **12**(5): 3117-3132.

Filippi-Chiela, E. C., M. M. Oliveira, B. Jurkovski, S. M. Callegari-Jacques, V. D. da Silva and G. Lenz (2012). "Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities." PLoS One **7**(8): e42522.

Filippi-Chiela, E. C., M. M. B. e. Silva, M. P. Thomé and G. Lenz (2015). "Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage." Autophagy **11**(7): 1099-1113.

Finkel, T. (2015). "The metabolic regulation of aging." Nat Med **21**(12): 1416.

Flohé, L. (2016). "The impact of thiol peroxidases on redox regulation." Free radical research **50**(2): 126-142.

Franceschi, C., P. Garagnani, P. Parini, C. Giuliani and A. Santoro (2018). "Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases." Nature Reviews Endocrinology **14**(10): 576.

Frank, A. K., D. C. Tran, R. W. Qu, B. A. Stohr, D. J. Segal and L. Xu (2015). "The Shelterin TIN2 Subunit Mediates Recruitment of Telomerase to Telomeres." PLoS Genet **11**(7): e1005410.

Frasca, D., B. B. Blomberg and R. Paganelli (2017). "Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases." Front Immunol **8**: 1745.

Freije, J. M. and C. López-Otín (2012). "Reprogramming aging and progeria." Current opinion in cell biology **24**(6): 757-764.

Freund, A., R.-M. Laberge, M. Demaria and J. Campisi (2012). "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker." Mol Biol Cell **23**(11): 2066-2075.

Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura (2017). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.

Gallage, S. and J. Gil (2016). "Mitochondrial Dysfunction Meets Senescence." Trends Biochem Sci **41**(3): 207-209.

Galluzzi, L., E. H. Baehrecke, A. Ballabio, P. Boya, J. M. Bravo-San Pedro, F. Cecconi, A. M. Choi, C. T. Chu, P. Codogno and M. I. Colombo (2017). "Molecular definitions of autophagy and related processes." EMBO J **36**(13): 1811-1836.

García-Prat, L., M. Martínez-Vicente, E. Perdiguero, L. Ortet, J. Rodríguez-Ubreva, E. Rebollo, V. Ruiz-Bonilla, S. Gutarra, E. Ballestar and A. L. Serrano (2016). "Autophagy maintains stemness by preventing senescence." Nature **529**(7584): 37.

Genova, M. L. and G. Lenaz (2015). "The interplay between respiratory supercomplexes and ROS in aging." Antioxidants & redox signaling **23**(3): 208-238.

Gilson, E. and V. Géli (2007). "How telomeres are replicated." Nature reviews Molecular cell biology **8**(10): 825.

Gimble, J. M., W. Grayson, F. Guilak, M. J. Lopez and G. Vunjak-Novakovic (2011). "Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 69-81.

Gnecchi, M., P. Danieli, G. Malpasso and M. C. Ciuffreda (2016). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. Mesenchymal Stem Cells, Springer: 123-146.

Gorgoulis, V., P. D. Adams, A. Alimonti, D. C. Bennett, O. Bischof, C. Bishop, J. Campisi, M. Collado, K. Evangelou and G. Ferbeyre (2019). "Cellular senescence: defining a path forward." Cell **179**(4): 813-827.

Gottlieb, R. A. and R. S. Carreira (2010). "Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life." American Journal of Physiology-Cell Physiology **299**(2): C203-C210.

Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity." Annu Rev Immunol **29**: 415-445.

Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2): 405-413.

Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1987). "The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity." Cell **51**(6): 887-898.

Griffith, J. D., L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss and T. De Lange (1999). "Mammalian telomeres end in a large duplex loop." Cell **97**(4): 503-514.

Grun, L., V. Pierdoná, F. Guma and F. Barbé-Tuana (2019). "Telomeres: Chromosome End Protective-Complexes and Its Association with Chronic Diseases." J Mol Cell Biol Forecast. 2019; 2 (2) **1018**.

Grun, L. K., N. D. R. Teixeira, Jr., L. V. Mengden, M. A. de Bastiani, M. M. Parisi, R. Bortolin, P. Lavandoski, V. Pierdona, L. B. Alves, J. C. F. Moreira, C. C. Mottin, M. H. Jones, F. Klamt, A. V. Padoin, F. C. R. Guma and F. M. Barbe-Tuana (2018). "TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity." Free Radic Biol Med **129**: 286-295.

Grundy, S. M. (2016). "Metabolic syndrome update." Trends in cardiovascular medicine **26**(4): 364-373.

Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri and M. P. Czech (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 367-377.

Harley, C. B. (1991). "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?" Mutation Research/DNAging **256**(2-6): 271-282.

Harman, D. (1992). "Free radical theory of aging." Mutation Research/DNAging **275**(3-6): 257-266.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Experimental cell research **25**(3): 585-621.

Heinonen, S., J. Buzkova, M. Muniandy, R. Kaksonen, M. Ollikainen, K. Ismail, A. Hakkarainen, J. Lundbom, N. Lundbom and K. Vuolteenaho (2015). "Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity." Diabetes **64**(9): 3135-3145.

Hernandez-Segura, A., J. Nehme and M. Demaria (2018). "Hallmarks of cellular senescence." Trends in cell biology **28**(6): 436-453.

Herranz, N. and J. Gil (2018). "Mechanisms and functions of cellular senescence." J Clin Invest **128**(4): 1238-1246.

Heydarkhan-Hagvall, S., K. Schenke-Layland, J. Q. Yang, S. Heydarkhan, Y. Xu, P. A. Zuk, W. R. MacLellan and R. E. Beygui (2008). "Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering." Cells Tissues Organs **187**(4): 263-274.

Hinds, P. and J. Pietruska (2017). "Senescence and tumor suppression." F1000Res **6**.

Holohan, B., W. E. Wright and J. W. Shay (2014). "Telomeropathies: An emerging spectrum disorder." J Cell Biol **205**(3): 289-299.

Hoppel, C. L., E. J. Lesnefsky, Q. Chen and B. Tandler (2017). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular aging. Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine, Springer: 451-464.

Horn, R. C., G. T. Gelatti, N. C. Mori, A. C. Tissiani, M. S. Mayer, E. A. Pereira, M. Ross, P. R. Moreira, J. W. Bortolotto and T. Felippin (2017). "Obesity, bariatric surgery and oxidative stress." Revista da Associação Médica Brasileira **63**(3): 229-235.

Hukezalie, K. R. and J. M. Wong (2013). "Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme." FEBS J **280**(14): 3194-3204.

Iglay, K., H. Hannachi, P. Joseph Howie, J. Xu, X. Li, S. S. Engel, L. M. Moore and S. Rajpathak (2016). "Prevalence and co-prevalence of comorbidities among patients with type 2 diabetes mellitus." Current Medical Research and Opinion **32**(7): 1243-1252.

Ito, K. and T. Suda (2014). "Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(4): 243-256.

Jayanthi, R., A. R. Srinivasan, M. Hanifah and A. L. Maran (2017). "Associations among Insulin resistance, triacylglycerol/high density lipoprotein (TAG/HDL ratio) and thyroid hormone levels—a study on type 2 diabetes mellitus in obese and overweight subjects." Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews **11**: S121-S126.

Jiang, P., W. Du, A. Mancuso, K. E. Wellen and X. Yang (2013). "Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence." Nature **493**(7434): 689.

Jiang, T., B. Harder, M. R. De La Vega, P. K. Wong, E. Chapman and D. D. Zhang (2015). "p62 links autophagy and Nrf2 signaling." Free Radical Biology and Medicine **88**: 199-204.

Jiang, T., B. Harder, M. Rojo de la Vega, P. K. Wong, E. Chapman and D. D. Zhang (2015). "p62 links autophagy and Nrf2 signaling." Free Radic Biol Med **88**(Pt B): 199-204.

Johmura, Y. and M. Nakanishi (2016). "Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance." Cancer science **107**(11): 1550-1555.

Jones, R. G., D. R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M. J. Birnbaum and C. B. Thompson (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." Mol Cell **18**(3): 283-293.

Jongbloed, F., R. Meijers, J. IJzermans, R. Klaassen, M. Dollé, S. van den Berg, M. Betjes, R. de Bruin, E. van der Harst and N. Litjens (2019). "Effects of bariatric surgery on telomere length and T-cell aging." Int J Obes (Lond): 1.

Jung, S. H., H. J. Hwang, D. Kang, H. A. Park, H. C. Lee, D. Jeong, K. Lee, H. J. Park, Y.-G. Ko and J.-S. Lee (2019). "mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53." Oncogene **38**(10): 1639-1650.

Kang, C., Q. Xu, T. D. Martin, M. Z. Li, M. Demaria, L. Aron, T. Lu, B. A. Yankner, J. Campisi and S. J. Elledge (2015). "The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4." Science **349**(6255): aaa5612.

Kang, H. T., K. B. Lee, S. Y. Kim, H. R. Choi and S. C. Park (2011). "Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts." PLoS One **6**(8): e23367.

Kim, G. H., J. E. Kim, S. J. Rhie and S. Yoon (2015). "The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases." Experimental neurobiology **24**(4): 325-340.

Klionsky, D. J. and P. Codogno (2013). "The mechanism and physiological function of macroautophagy." Journal of innate immunity **5**(5): 427-433.

Knopp, R. H. and P. Paramsothy (2006). *Oxidized LDL and abdominal obesity: a key to understanding the metabolic syndrome*, Oxford University Press.

Kocak, H., Y. Oner-Iyidogan, F. Gurdol, P. Oner, R. Suzme, D. Esin and H. Issever (2007). "Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin." Clin Exp Med **7**(4): 173-178.

Kondratov, R. V., A. A. Kondratova, V. Y. Gorbacheva, O. V. Vykhovanets and M. P. Antoch (2006). "Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock." Genes & development **20**(14): 1868-1873.

Kong, C. M., X. W. Lee and X. Wang (2013). "Telomere shortening in human diseases." FEBS J **280**(14): 3180-3193.

Kovsan, J., M. Blüher, T. Tarnovscki, N. Klötting, B. Kirshtein, L. Madar, I. Shai, R. Golan, I. Harman-Boehm and M. R. Schön (2011). "Altered autophagy in human adipose tissues in obesity." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **96**(2): E268-E277.

Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." Genes & development **24**(22): 2463-2479.

Kulaberoglu, Y., R. Gundogdu and A. Hergovich (2016). *The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair*. Genome Stability, Elsevier: 243-256.

Kwon, Y.-Y., K.-M. Choi, C. Cho and C.-K. Lee (2015). "Mitochondrial efficiency-dependent viability of *Saccharomyces cerevisiae* mutants carrying individual electron transport chain component deletions." Mol Cells **38**(12): 1054.

Kwon, Y., J. W. Kim, J. A. Jeoung, M.-S. Kim and C. Kang (2017). "Autophagy is pro-senescence when seen in close-up, but anti-senescence in long-shot." Mol Cells **40**(9): 607.

Kyoh, S., N. Venkatesan, A. H. Poon, M. Nishioka, T.-Y. Lin, C. J. Baglole, D. H. Eidelman and Q. Hamid (2013). "Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **132**(2): 480-482. e482.

Lackey, D. E. and J. M. Olefsky (2016). "Regulation of metabolism by the innate immune system." Nature Reviews Endocrinology **12**(1): 15.

Lagathu, C., L. Yvan-Charvet, J. P. Bastard, M. Maachi, A. Quignard-Boulange, J. Capeau and M. Caron (2006). "Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes." Diabetologia **49**(9): 2162-2173.

Landry, W. D. and T. G. Cotter (2014). ROS signalling, NADPH oxidases and cancer, Portland Press Limited.

Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase." Aging Cell **5**(2): 187-195.

Lee, H.-C. and Y.-H. Wei (2005). "Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress." The international journal of biochemistry & cell biology **37**(4): 822-834.

Lee, H.-C., P.-H. Yin, C.-W. Chi and Y.-H. Wei (2002). "Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence." Journal of biomedical science **9**(6): 517-526.

Lee, H. and Y. Yoon (2016). "Mitochondrial fission and fusion." Biochemical Society Transactions **44**(6): 1725-1735.

Lee, H. C. and Y. H. Wei (2012). "Mitochondria and aging." Adv Exp Med Biol **942**: 311-327.

Lee, J. Y., K.-R. Yu, B.-C. Lee, I. Kang, J.-J. Kim, E.-J. Jung, H.-S. Kim, Y. Seo, S. W. Choi and K.-S. Kang (2018). "GATA4-dependent regulation of the secretory phenotype via MCP-1 underlies lamin A-mediated human mesenchymal stem cell aging." Experimental & molecular medicine **50**(5): 63.

- Lee, M. J., J. Kim, M. Y. Kim, Y. S. Bae, S. H. Ryu, T. G. Lee and J. H. Kim (2010). "Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." J Proteome Res **9**(4): 1754-1762.
- Levy, M. Z., R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider and C. B. Harley (1992). "Telomere end-replication problem and cell aging." Journal of molecular biology **225**(4): 951-960.
- Li, T., X. Liu, L. Jiang, J. Manfredi, S. Zha and W. Gu (2016). "Loss of p53-mediated cell-cycle arrest, senescence and apoptosis promotes genomic instability and premature aging." Oncotarget **7**(11): 11838.
- Lisby, M., T. Teixeira, E. Gilson and V. Géli (2010). "The fate of irreparable DNA double-strand breaks and eroded telomeres at the nuclear periphery." Nucleus **1**(2): 158-161.
- Liu, B., J. Yi, X. Yang, L. Liu, X. Lou, Z. Zhang, H. Qi, Z. Wang, J. Zou and W.-G. Zhu (2019). "MDM2-mediated degradation of WRN promotes cellular senescence in a p53-independent manner." Oncogene **38**(14): 2501.
- Liu, J.-Y., G. P. Souroullas, B. O. Diekman, J. Krishnamurthy, B. M. Hall, J. A. Sorrentino, J. S. Parker, G. A. Sessions, A. V. Gudkov and N. E. Sharpless (2019). "Cells exhibiting strong p16INK4a promoter activation in vivo display features of senescence." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(7): 2603-2611.
- Liu, W. J., L. Ye, W. F. Huang, L. J. Guo, Z. G. Xu, H. L. Wu, C. Yang and H. F. Liu (2016). "p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation." Cell Mol Biol Lett **21**: 29.
- Liu, Z., T. Zhou, A. C. Ziegler, P. Dimitrion and L. Zuo (2017). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications." Oxidative medicine and cellular longevity **2017**.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Longo, M., F. Zatterale, J. Naderi, L. Parrillo, P. Formisano, G. A. Raciti, F. Beguinot and C. Miele (2019). "Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications." Int J Mol Sci **20**(9): 2358.
- López-Otín, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.
- Louwen, F., A. Ritter, N. N. Kreis and J. Yuan (2018). "Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells." Obes Rev **19**(7): 888-904.

Lue, N. F. (2018). "Evolving linear chromosomes and telomeres: a C-strand-centric view." Trends in biochemical sciences **43**(5): 314-326.

Mangum, L. H., S. Natesan, R. Stone, 2nd, N. L. Wrice, D. A. Larson, K. F. Florell, B. A. Christy, M. C. Herzig, A. P. Cap and R. J. Christy (2017). "Tissue Source and Cell Expansion Condition Influence Phenotypic Changes of Adipose-Derived Stem Cells." Stem Cells Int **2017**: 7108458.

Marion, R. M., I. Lopez de Silanes, L. Mosteiro, B. Gamache, M. Abad, C. Guerra, D. Megias, M. Serrano and M. A. Blasco (2017). "Common Telomere Changes during In Vivo Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis." Stem Cell Reports **8**(2): 460-475.

Marseglia, L., S. Manti, G. D'Angelo, A. Nicotera, E. Parisi, G. Di Rosa, E. Gitto and T. Arrigo (2015). "Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases." Int J Mol Sci **16**(1): 378-400.

Martínez, P. and M. A. Blasco (2017). "Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies." J Cell Biol **216**(4): 875-887.

Matera, A. G., R. M. Terns and M. P. Terns (2007). "Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs." Nature reviews Molecular cell biology **8**(3): 209.

Mellor, L. F., M. Mohiti-Asli, J. Williams, A. Kannan, M. R. Dent, F. Guilak and E. G. Loba (2015). "Extracellular Calcium Modulates Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells: A Novel Approach for Osteochondral Tissue Engineering Using a Single Stem Cell Source." Tissue Eng Part A **21**(17-18): 2323-2333.

Mengel-From, J., M. Thinggaard, C. Dalgard, K. O. Kyvik, K. Christensen and L. Christiansen (2014). "Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly." Hum Genet **133**(9): 1149-1159.

Meyer, J. N., T. C. Leuthner and A. L. Luz (2017). "Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity." Toxicology **391**: 42-53.

Mitchell, J. R., E. Wood and K. Collins (1999). "A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita." Nature **402**(6761): 551.

Mitra, M., L. D. Ho and H. A. Collier (2018). An in vitro model of cellular quiescence in primary human dermal fibroblasts. Cellular Quiescence, Springer: 27-47.

Mordas, A. and K. Tokatlidis (2015). "The MIA pathway: a key regulator of mitochondrial oxidative protein folding and biogenesis." Accounts of chemical research **48**(8): 2191-2199.

Morgunova, G., A. Kolesnikov, A. Klebanov and A. Khokhlov (2015). "Senescence-associated β -galactosidase—A biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction?" Moscow University biological sciences bulletin **70**(4): 165-167.

Moschen, A. R., C. Molnar, S. Geiger, I. Graziadei, C. F. Ebenbichler, H. Weiss, S. Kaser, A. Kaser and H. Tilg (2010). "Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression." Gut **59**(9): 1259-1264.

Mouchiroud, L., R. H. Houtkooper, N. Moullan, E. Katsyuba, D. Ryu, C. Cantó, A. Mottis, Y.-S. Jo, M. Viswanathan and K. Schoonjans (2013). "The NAD⁺/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling." Cell **154**(2): 430-441.

Munoz-Espin, D., M. Canamero, A. Maraver, G. Gomez-Lopez, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodriguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado and M. Serrano (2013). "Programmed cell senescence during mammalian embryonic development." Cell **155**(5): 1104-1118.

Munoz-Espin, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(7): 482-496.

Munoz-Espin, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nature reviews Molecular cell biology **15**(7): 482.

Murdolo, G., M. Piroddi, F. Luchetti, C. Tortoioli, B. Canonico, C. Zerbinati, F. Galli and L. Iuliano (2013). "Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance." Biochimie **95**(3): 585-594.

Nandakumar, J., C. F. Bell, I. Weidenfeld, A. J. Zaug, L. A. Leinwand and T. R. Cech (2012). "The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity." Nature **492**(7428): 285-289.

Nandakumar, J. and T. R. Cech (2013). "Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(2): 69-82.

Nardella, C., J. G. Clohessy, A. Alimonti and P. P. Pandolfi (2011). "Pro-senescence therapy for cancer treatment." Nature Reviews Cancer **11**(7): 503.

Narita, M., A. R. Young, S. Arakawa, S. A. Samarajiwa, T. Nakashima, S. Yoshida, S. Hong, L. S. Berry, S. Reichelt, M. Ferreira, S. Tavare, K. Inoki, S. Shimizu and M. Narita (2011). "Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes." Science **332**(6032): 966-970.

Núñez, C., V. Rodrigues, F. Gomes, R. De Moura, S. Victorio, B. Bombassaro, E. Chaim, J. Pareja, B. Geloneze and L. Velloso (2013). "Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity." Int J Obes (Lond) **37**(11): 1473.

O'Neill, S. and L. O'Driscoll (2015). "Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies." Obesity reviews **16**(1): 1-12.

Ohki, R., T. Tsurimoto and F. Ishikawa (2001). "In vitro reconstitution of the end replication problem." Mol Cell Biol **21**(17): 5753-5766.

Okazaki, R., T. Okazaki, K. Sakabe, K. Sugimoto and A. Sugino (1968). "Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains." Proc Natl Acad Sci U S A **59**(2): 598-605.

Olovnikov, A. M. (1996). "Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory." Exp Gerontol **31**(4): 443-448.

Olsen, R. K., N. Cornelius and N. Gregersen (2015). "Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism." Journal of inherited metabolic disease **38**(4): 703-719.

Onate, B., G. Vilahur, S. Camino-Lopez, A. Diez-Caballero, C. Ballesta-Lopez, J. Ybarra, F. Moscattiello, J. Herrero and L. Badimon (2013). "Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype." BMC Genomics **14**: 625.

Organization, W. H. (2017). Obesity and overweight. Fact sheet [updated June 2016]. Öst, A., K. Svensson, I. Ruishalme, C. Brännmark, N. Franck, H. Krook, P. Sandström, P. Kjolhede and P. Strålfors (2010). "Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes." Molecular medicine **16**(7): 235.

Otten, E. G., R. Stefanatos, B. Carroll and V. I. Korolchuk (2018). "Oxidation of p62 as an evolutionary adaptation to promote autophagy in stress conditions." Cell stress **2**(4): 91.

Ovadya, Y. and V. Krizhanovsky (2014). "Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies." Biogerontology **15**(6): 627-642.

Paradies, G., G. Petrosillo, V. Paradies and F. M. Ruggiero (2010). "Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging." Free Radical Biology and Medicine **48**(10): 1286-1295.

Parisi, M. M., L. K. Grun, P. Lavandoski, L. B. Alves, I. J. Bristot, R. Mattiello, C. C. Mottin, F. Klamt, M. H. Jones, A. V. Padoin, F. C. R. Guma and F. M. Barbe-Tuana (2017). "Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused

Cell Signaling Dysfunction and Inflammation." Obesity (Silver Spring) **25**(9): 1523-1531.

Passos, J. F., C. Simillion, J. Hallinan, A. Wipat and T. Von Zglinicki (2009). "Cellular senescence: unravelling complexity." Age (Dordr) **31**(4): 353-363.

Patel, R. S., G. Carter, G. El Bassit, A. A. Patel, D. R. Cooper, M. Murr and N. A. Patel (2016). "Adipose-derived stem cells from lean and obese humans show depot specific differences in their stem cell markers, exosome contents and senescence: role of protein kinase C delta (PKC δ) in adipose stem cell niche." Stem cell investigation **3**.

Pawelec, G., D. Goldeck and E. Derhovanessian (2014). "Inflammation, ageing and chronic disease." Curr Opin Immunol **29**: 23-28.

Pérez, L. M., A. Bernal, B. de Lucas, N. San Martin, A. Mastrangelo, A. García, C. Barbas and B. G. Gálvez (2015). "Altered metabolic and stemness capacity of adipose tissue-derived stem cells from obese mouse and human." PLoS One **10**(4): e0123397.

Petrangeli, E., G. Coroniti, A. T. Brini, L. De Girolamo, D. Stanco, S. Niada, G. Silecchia, E. Morgante, C. Lubrano and M. A. Russo (2016). "Hypoxia promotes the inflammatory response and stemness features in visceral fat stem cells from obese subjects." J Cell Physiol **231**(3): 668-679.

Prescott, J., I. M. Wentzensen, S. A. Savage and I. De Vivo (2012). "Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **730**(1-2): 75-84.

Rando, T. A. and H. Y. Chang (2012). "Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock." Cell **148**(1-2): 46-57.

Reilly, S. M. and A. R. Saltiel (2017). "Adapting to obesity with adipose tissue inflammation." Nature Reviews Endocrinology **13**(11): 633.

Révész, D., Y. Milaneschi, J. E. Verhoeven, J. Lin and B. W. Penninx (2015). "Longitudinal associations between metabolic syndrome components and telomere shortening." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **100**(8): 3050-3059.

Révész, D., Y. Milaneschi, J. E. Verhoeven and B. W. Penninx (2014). "Telomere length as a marker of cellular aging is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **99**(12): 4607-4615.

Révész, D., J. E. Verhoeven, M. Picard, J. Lin, S. Sidney, E. S. Epel, B. W. Penninx and E. Puterman (2017). "Associations between cellular aging markers and metabolic syndrome: findings from the CARDIA study." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **103**(1): 148-157.

Reznick, R. M., H. Zong, J. Li, K. Morino, I. K. Moore, J. Y. Hannah, Z.-X. Liu, J. Dong, K. J. Mustard and S. A. Hawley (2007). "Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis." Cell Metab **5**(2): 151-156.

Rubinsztein, D. C., G. Mariño and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." Cell **146**(5): 682-695.

Rubtsova, M. P., D. P. Vasilkova, A. N. Malyavko, Y. V. Naraikina, M. I. Zvereva and O. A. Dontsova (2012). "Telomere lengthening and other functions of telomerase." Acta Naturae **4**(2): 44-61.

Rusten, T. E. and H. Stenmark (2010). "p62, an autophagy hero or culprit?" Nat Cell Biol **12**(3): 207.

Salama, R., M. Sadaie, M. Hoare and M. Narita (2014). "Cellular senescence and its effector programs." Genes & development **28**(2): 99-114.

Salpea, K. D. and S. E. Humphries (2010). "Telomere length in atherosclerosis and diabetes." Atherosclerosis **209**(1): 35-38.

Salvestrini, V., C. Sell and A. Lorenzini (2019). "Obesity May Accelerate the Aging Process." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 266.

Sandalio, L. and M. Romero-Puertas (2015). "Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks." Annals of Botany **116**(4): 475-485.

Sanders, J. L., A. L. Fitzpatrick, R. M. Boudreau, A. M. Arnold, A. Aviv, M. Kimura, L. F. Fried, T. B. Harris and A. B. Newman (2011). "Leukocyte telomere length is associated with noninvasively measured age-related disease: the Cardiovascular Health Study." Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences **67**(4): 409-416.

Scarpulla, R. C. (2011). "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1813**(7): 1269-1278.

Scott, I. and R. J. Youle (2010). "Mitochondrial fission and fusion." Essays in biochemistry **47**: 85-98.

Scott, M. A., V. T. Nguyen, B. Levi and A. W. James (2011). "Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **20**(10): 1793-1804.

Sena, L. A. and N. S. Chandel (2012). "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." Mol Cell **48**(2): 158-167.

Sfeir, A. (2012). Telomeres at a glance, The Company of Biologists Ltd.

Sfeir, A., S. T. Kosiyatrakul, D. Hockemeyer, S. L. MacRae, J. Karlseder, C. L. Schildkraut and T. de Lange (2009). "Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication." Cell **138**(1): 90-103.

Shammas, M. A. (2011). "Telomeres, lifestyle, cancer, and aging." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **14**(1): 28.

Sharpless, N. E. and C. J. Sherr (2015). "Forging a signature of in vivo senescence." Nature Reviews Cancer **15**(7): 397.

Shimi, T., V. Butin-Israeli, S. A. Adam, R. B. Hamanaka, A. E. Goldman, C. A. Lucas, D. K. Shumaker, S. T. Kosak, N. S. Chandel and R. D. Goldman (2011). "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence." Genes & development **25**(24): 2579-2593.

Shoshani, O. and D. Zipori (2015). "Stress as a fundamental theme in cell plasticity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms **1849**(4): 371-377.

Siklova-Vitkova, M., E. Klimcakova, J. Polak, Z. Kovacova, M. Tencerova, L. Rossmeislova, M. Bajzova, D. Langin and V. Stich (2012). "Adipose tissue secretion and expression of adipocyte-produced and stromavascular fraction-produced adipokines vary during multiple phases of weight-reducing dietary intervention in obese women." J Clin Endocrinol Metab **97**(7): E1176-1181.

Silva, K. R., S. Liechocki, J. R. Carneiro, C. Claudio-da-Silva, C. M. Maya-Monteiro, R. Borojevic and L. S. Baptista (2015). "Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women." Stem Cell Res Ther **6**(1): 72.

Singer, M. A. (2016). "The Origins of Aging: Evidence that Aging is an Adaptive Phenotype." Curr Aging Sci **9**(2): 95-115.

Skelton, J. A., M. B. Irby, J. G. Grzywacz and G. Miller (2011). "Etiologies of obesity in children: nature and nurture." Pediatr Clin North Am **58**(6): 1333-1354, ix.

Storer, M. and W. M. Keyes (2014). "Developing senescence to remodel the embryo." Commun Integr Biol **7**(5).

Strazhesko, I., O. Tkacheva, S. Boytsov, D. Akasheva, E. Dudinskaya, V. Vygodin, D. Skvortsov and P. Nilsson (2015). "Association of insulin resistance, arterial stiffness and telomere length in adults free of cardiovascular diseases." PLoS One **10**(8): e0136676.

Strzyz, P. (2016). "Cell senescence: controlling the senescence-associated secretory phenotype." Nature reviews Molecular cell biology **17**(12): 740.

Suen, D.-F., K. L. Norris and R. J. Youle (2008). "Mitochondrial dynamics and apoptosis." Genes & development **22**(12): 1577-1590.

Symonds, M. E., A. Mostyn, S. Pearce, H. Budge and T. Stephenson (2003). "Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development." J Endocrinol **179**(3): 293-299.

Szostak, J. W. and E. H. Blackburn (1982). "Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors." Cell **29**(1): 245-255.

Tai, H., Z. Wang, H. Gong, X. Han, J. Zhou, X. Wang, X. Wei, Y. Ding, N. Huang and J. Qin (2017). "Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence." Autophagy **13**(1): 99-113.

Thome, M. P., E. C. Filippi-Chiela, E. S. Villodre, C. B. Migliavaca, G. R. Onzi, K. B. Felipe and G. Lenz (2016). "Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy." J Cell Sci **129**(24): 4622-4632.

Tonnessen-Murray, C. A., G. Lozano and J. G. Jackson (2017). "The regulation of cellular functions by the p53 protein: cellular senescence." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **7**(2): a026112.

Traganos, F. and Z. Darzynkiewicz (1994). Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. Methods in cell biology, Elsevier. **41**: 185-194.

Van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." Nature **509**(7501): 439.

Waaijer, M. E., W. E. Parish, B. H. Strongitharm, D. van Heemst, P. E. Slagboom, A. J. de Craen, J. M. Sedivy, R. G. Westendorp, D. A. Gunn and A. B. Maier (2012). "The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age." Aging Cell **11**(4): 722-725.

Wachsmuth, M., A. Huebner, M. Li, B. Madea and M. Stoneking (2016). "Age-related and heteroplasmy-related variation in human mtDNA copy number." PLoS Genet **12**(3): e1005939.

Wang, C.-H., S.-B. Wu, Y.-T. Wu and Y.-H. Wei (2013). "Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging." Experimental Biology and Medicine **238**(5): 450-460.

Wang, Y., X. D. Wang, E. Lapi, A. Sullivan, W. Jia, Y. W. He, I. Ratnayaka, S. Zhong, R. D. Goldin, C. G. Goemans, A. M. Tolkovsky and X. Lu (2012). "Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic RAS." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(33): 13325-13330.

- Watson, J. D. (1972). "Origin of concatemeric T7DNA." Nature New Biology **239**(94): 197-201.
- Webb, C. J., Y. Wu and V. A. Zakian (2013). "DNA repair at telomeres: keeping the ends intact." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(6): a012666.
- Wellinger, R. J. (2014). "In the end, what's the problem?" Mol Cell **53**(6): 855-856.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." Nature reviews Molecular cell biology **11**(12): 872.
- Weyemi, U., P. R. Parekh, C. E. Redon and W. M. Bonner (2012). "SOD2 deficiency promotes aging phenotypes in mouse skin." Aging (Albany NY) **4**(2): 116.
- Wiley, C. D., M. C. Velarde, P. Lecot, S. Liu, E. A. Sarnoski, A. Freund, K. Shirakawa, H. W. Lim, S. S. Davis, A. Ramanathan, A. A. Gerencser, E. Verdin and J. Campisi (2016). "Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype." Cell Metab **23**(2): 303-314.
- Xia, S., X. Zhang, S. Zheng, R. Khanabdali, B. Kalionis, J. Wu, W. Wan and X. Tai (2016). "An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment." J Immunol Res **2016**: 8426874.
- Xin, H., D. Liu and Z. Songyang (2008). "The telosome/shelterin complex and its functions." Genome Biol **9**(9): 232.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol **12**(9): 814.
- Yin, Z., C. Pascual and D. J. Klionsky (2016). "Autophagy: machinery and regulation." Microb Cell **3**(12): 588.
- Yosef, R., N. Pilpel, R. Tokarsky-Amiel, A. Biran, Y. Ovadya, S. Cohen, E. Vadai, L. Dassa, E. Shahar and R. Condiotti (2016). "Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL." Nature communications **7**: 11190.
- Yoshino, J., K. F. Mills, M. J. Yoon and S.-i. Imai (2011). "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice." Cell Metab **14**(4): 528-536.
- Young, A. R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S. Tavaré, S. Arakawa, S. Shimizu and F. M. Watt (2009). "Autophagy mediates the mitotic senescence transition." Genes & development **23**(7): 798-803.
- Zaug, A. J., E. R. Podell, J. Nandakumar and T. R. Cech (2010). "Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase." Genes & development **24**(6): 613-622.

Zhang, R., Y. Wang, K. Ye, M. Picard and Z. Gu (2017). "Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans." BMC Genomics **18**(1): 890.

Zhu, Y., T. Tchkonina, H. Fuhrmann-Stroissnigg, H. M. Dai, Y. Y. Ling, M. B. Stout, T. Pirskhalava, N. Giorgadze, K. O. Johnson and C. B. Giles (2016). "Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors." Aging Cell **15**(3): 428-435.

Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release." Physiological reviews **94**(3): 909-950.

Zubakov, D., F. Liu, I. Kokmeijer, Y. Choi, J. B. J. van Meurs, I. W. F. J. van, A. G. Uitterlinden, A. Hofman, L. Broer, C. M. van Duijn, J. Lewin and M. Kayser (2016). "Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length." Forensic Sci Int Genet **24**: 33-43.

ANEXOS

LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES

8-isoprostano EIA kit	Cayman Chemical, EUA, # 516351
Acridine Orange	Sigma Aldrich, EUA, #A9231
AdipoRed™	Lonza, EUA, #PT-7009
Anfotericina B	Gibco, EUA, #LS15290026
Anti-Caspase-3 ativa-PE	BD Pharmingen™, EUA, (1:30, clone C92-605)
Anti-TRF1-Alexa Fluor 647	Santa Cruz Biotechnology, EUA, (1:30, clone G-7)
Bafilomicina A1	Sigma Aldrich, EUA, #B1793
C₁₂FDG	Sigma Aldrich, EUA, #F2756)
CD105-PE	Invitrogen, EUA, (1:30, clone SN6)
CD34-FITC	BD Pharmingen™, EUA, (1:30 clone 581)
DMEM <i>low glucose</i>	Sigma Aldrich, EUA, # D5523
DTNB (Reagente de Ellman)	Thermo Fisher, EUA, #22582
Fenol: Clorofórmio: A. isoamil	Sigma Aldrich, EUA, # P2069
hADSC	Lonza, EUA, #PT-5006
<i>High-Capacity cDNA RT kit</i>	Applied Biosystems, EUA #4368814
Histopaque®-1077	Sigma Aldrich, EUA, # 10771
Hoescht 33258	Invitrogen, EUA, #H1398
Anexina V-FITC e (PI) kit	BD Biosciences, EUA, #556547
Transcription factor ligant kit	BD Pharmingen™, EUA
MasterMix 2X Taqman/Rox	Quatro G, Brasil, #100030
MitoSOX™ Red	Molecular Probes, EUA, #M36008
<i>MitoTracker™ Green FM</i>	Thermo Fisher, EUA, #M7514

<i>MitoTracker™ Red CMXRos</i>	Thermo Fisher, EUA, #M7512
<i>o-Phthalaldehyde (OPA)</i>	Sigma Aldrich, EUA, #P0657
Penicilina/streptomicina	Gibco, EUA, #15070
<i>Platinum® Taq Polymerase</i>	Invitrogen, EUA, #10966030
Proteinase K	Promega, EUA, # V3021
Soro Fetal Bovino	Cripion Biotecnologia, Brasil, #FB 0010S
SYBR® Green I	Molecular Probes, EUA, #S7563
Taq DNA Polimerase	Quatro G, Brasil, #100040
TRIzol LS®	Invitrogen, EUA, #10296010

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PARTE I

Introdução

Figura 1. Marcadores do envelhecimento biológico.....	19
Figura 2. Localização e estrutura do complexo telomérico nos cromossomos eucarióticos.....	23
Figura 3. Características fenotípicas de células senescentes.....	28
Figura 4. Ciclo de vida e dinâmica mitocondrial.....	35
Figura 5. Senescência associada à disfunção mitocondrial (MiDAS).....	39
Figura 6. Composição do tecido adiposo na progressão da obesidade.....	42

PARTE II

Capítulo 1

<i>Figure 1. Chromosomes and telomeres.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 2. Schematic model of telomeric DNA structure stabilized by the shelterin complex.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 3. Telomerase enzyme and its regulatory proteins.....</i>	<i>52</i>

Capítulo 2

<i>Figure 1. Shorter telomeres among individuals with obesity.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 2. Individuals with obesity showed increased gene expression levels of shelterin components.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 3. Increased macromolecules' damage in plasma from subjects with obesity.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 4. Plot depicting gene interactions between significantly different ($p < 0.05$) variables.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 5. TRF1 as a major contributor for clustering among the groups.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 6. Augmented TRF1 protein expression.....</i>	<i>64</i>
<i>Supplementary Figure 1. Correlation plot showing r coefficients (sized and colored squares) and p values among all sets of observed variables.....</i>	<i>72</i>

Capítulo 3

Figura 1. Altas concentrações de plasma induzem morte de hADSC.....	90
Figura 2. A exposição ao ambiente obesogênico não altera a viabilidade celular.....	92
Figura 3. Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz senescência.....	94
Figura 4. Morfometria nuclear não indica senescência em hADSC tratadas com plasma.....	96

Figura 5. A exposição ao plasma de indivíduos portadores de obesidade induz a despolarização da membrana mitocondrial.....	97
Figura 6. Diminuição do conteúdo mitocondrial e comprometimento da autofagia.....	100
Figura 7. Conteúdo de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot-}$) não é alterado pelo tratamento com plasma.....	101
Figura 8. Tratamento com plasma de indivíduos portadores de obesidade induz acúmulo de gotas lipídicas.....	103
Figura 9. Tratamento com plasma de obesos aumenta a expressão de TRF1.....	104

PARTE III

Discussão

Figura 1. Visão geral dos resultados obtidos nessa tese, que sustentam a hipótese de que a obesidade é uma doença associada ao fenótipo senescente.....	111
---	-----

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Capítulo 2

<i>Table 1. Baseline and demographic characteristics.....</i>	<i>62</i>
<i>Supplementary table 1. Primers' sequence and specific running conditions.....</i>	<i>69</i>
<i>Supplementary table 2. Results from imputed and non-imputed incomplete data sets.....</i>	<i>70</i>
<i>Supplementary table 3. Baseline and demographic characteristics from second patient recruitment.....</i>	<i>71</i>

Capítulo 3

Tabela 1. Sequência dos iniciadores e condições das reações de qPCR.....	85
Tabela 2. Características demográficas dos participantes do estudo.....	88

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

1. QUAL É OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO?

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

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

O paciente, ou responsável legal serão convidados a responder perguntas que revisam aspectos clínicos, sociais e de saúde, do paciente e de seus familiares. Os pacientes serão convidados a responder a dois questionários relacionados à qualidade de vida relacionada à

saúde e ambiente familiar (Questionário de Qualidade de Vida-SF-36 e Questionário FACES III).

Esses questionários serão realizados por um entrevistador. Após o preenchimento dos questionários, será solicitada aos pacientes a permissão para a coleta de uma amostra de esfregaço de células da bochecha interna da boca (mucosa oral) e coleta de 1 ml de sangue do seu braço (sangue periférico). As coletas serão realizadas por uma equipe treinada no período transoperatório.

3. QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

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

4. QUEM TERÁ ACESSO ÀS INFORMAÇÕES DESTE ESTUDO?

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

5. QUAIS SÃO AS COMPENSAÇÕES DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

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

6. PODEREI DESISTIR DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

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

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

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

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

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

ASSINATURAS

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

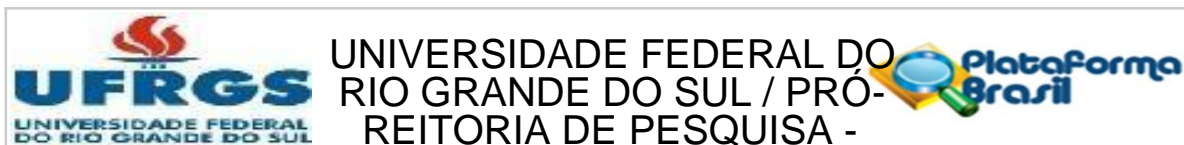
Nome do paciente (ou responsável)

Se responsável: () mãe () pai () outros: _____

Assinatura

Contatos: () _____
() _____

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26793114.0.0000.5347

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 640.817

Data da Relatoria: 20/03/2014

Apresentação do Projeto:

A obesidade é uma desordem definida pelo índice de massa corporal (IMC), relacionada diretamente com a porcentagem de gordura corporal total. Além de contribuir para o surgimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade acelera os processos celulares do envelhecimento, reduzindo a expectativa de vida. Este estudo, no contexto de uma dissertação de mestrado, avaliará o tamanho de telômeros em indivíduos obesos.

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios adequadamente apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Possui mérito.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE apresentado adequadamente

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

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do comprimento dos telômeros em pacientes obesos com indicação de tratamento cirúrgico e sua evolução após a cirurgia bariátrica **Pesquisador:** Alexandre Vontobel Padoin

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 29576014.4.1001.5336

Instituição Proponente: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 760.537

Data da Relatoria: 31/08/2014

Apresentação do Projeto:

Sem ressalvas.

Objetivo da Pesquisa:

Sem ressalvas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem ressalvas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem ressalvas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem ressalvas.

Recomendações:

Recomenda-se que o endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS seja atualizado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

MANUSCRITOS PUBLICADOS

1. **GRUN, LUCAS**; PIERDONA, V. ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA . Telomeres: Chromosome End Protective-Complexes and Its Association with Chronic Diseases. *Journal of Molecular and Cellular Biology Forecast*, v. 2, p. XX, 2019.
2. DE MIRANDA RAMOS, VITOR ; GASPAROTTO, JUCIANO ; FIGUEIRÓ, FABRÍCIO ; DE FRAGA DIAS, AMANDA ; ROSTIROLLA, DIANA CAROLINA ; SOMENSI, NAUANA ; DA ROSA, HELEN TAIS ; **GRUN, LUCAS KICH** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA ; GELAIN, DANIEL PENS ; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA . Retinoic acid downregulates thiol antioxidant defences and homologous recombination while promotes A549 cells sensitization to cisplatin. *CELLULAR SIGNALLING*, v. 62, p. 109356, 2019.
3. DE MEDEIROS, LIANA M. ; DE BASTIANI, MARCO A. ; RICO, EDUARDO P. ; SCHONHOFEN, PATRÍCIA ; PFAFFENSELLER, BIANCA ; WOLLENHAUPT-AGUIAR, BIANCA ; **GRUN, LUCAS** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; ZIMMER, EDUARDO R. ; CASTRO, MAURO A. A. ; PARSONS, RICHARD B. ; KLAMT, FÁBIO . Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer?s Disease Studies. *Molecular Neurobiology*, v. x, p. x, 2019.
4. **GRUN, LUCAS KICH**; TEIXEIRA, NEVTON DA ROSA ; MENGDEN, LÚCIA VON ; DE BASTIANI, MARCO ANTÔNIO ; PARISI, MARIANA MIGLIORINI ; BORTOLIN, RAFAEL ; LAVANDOSKI, PATRÍCIA ; PIERDONÁ, VINÍCIUS ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; JONES, MARCUS HERBERT ; KLAMT, FÁBIO ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA . TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, v. 129, p. 286-295, 2018.
5. CZEPIELEWSKI, LETICIA SANGUINETTI ; MASSUDA, RAFFAEL ; PANIZZUTTI, BRUNA ; **GRUN, LUCAS KICH** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA ; TEIXEIRA, ANTONIO LUCIO ; BARCH, DEANNA M ; GAMA, CLARISSA S . Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *SCHIZOPHRENIA BULLETIN*, v. 44, p. 158-167, 2018.
6. KLEBER SILVEIRA, ALEXANDRE ; MORESCO, KARLA SUZANA ; MAUTONE GOMES, HENRIQUE ; DA SILVA MORRONE, MAURÍLIO ; **KICH GRUN, LUCAS** ; PENS GELAIN, DANIEL ; DE MATTOS PEREIRA, LEANDRO ; GIONGO, ADRIANA ; RODRIGUES DE OLIVEIRA, RAFAEL ; FONSECA MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO . Guarana (Paullinia cupana Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, v. 32, p. 2466-2474, 2018.
7. VASCONCELOS-MORENO, MIRELA PAIVA ; FRIES, GABRIEL RODRIGO ; GUBERT, CAROLINA ; DOS SANTOS, BÁRBARA TIETBÖHL MARTINS QUADROS ; FIJTMAN, ADAM ; SARTORI, JULIANA ; FERRARI, PAMELA ; **GRUN, LUCAS KICH** ; PARISI, MARIANA MIGLIORINI ; GUMA, FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARIA ; KAPCZINSKI, FLÁVIO ; ROSA, ADRIANE RIBEIRO ; YATHAM, LAKSHMI N. ; KAUER-SANT?ANNA, MARCÍIA . Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY*, v. 20, p. 445-454, 2017.
8. PARISI, MARIANA MIGLIORINI ; **GRUN, LUCAS KICH** ; LAVANDOSKI, PATRÍCIA ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; BRISTOT, IVI JULIANA ; MATTIELLO, RITA ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; KLAMT, FÁBIO ; JONES, MARCUS HERBERT ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ;

- GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA . Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. *Obesity*, v. 25, p. 1523-1531, 2017.
9. DOS SANTOS, TIAGO MARCON ; KOLLING, JANAÍNA ; SIEBERT, CASSIANA ; BIASIBETTI, HELENA ; BERTÓ, CAROLINA GESSINGER ; **GRUN, LUCAS KICH** ; DALMAZ, CARLA ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA ; WYSE, ANGELA T.S. . Effects of previous physical exercise to chronic stress on long-term aversive memory and oxidative stress in amygdala and hippocampus of rats. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE*, v. 56, p. 58-67, 2017.
 10. MORESCO, KARLA SUZANA ; SILVEIRA, ALEXANDRE KLEBER ; ZEIDÁN-CHULIÁ, FARES ; CORREA, ANA PAULA FOLMER ; OLIVERIA, RAFAEL R. ; BORGES, ADRIANA GIONGO ; **GRUN, LUCAS** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; ZMOZINSKI, ARIANE ; BRANDELLI, ADRIANO ; VALE, MARIA GORETTI RODRIGUES ; GELAIN, DANIEL PENS ; BASSANI, VALQUIRIA LINCK ; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA . Effects of Achyrocline satureioides Inflorescence Extracts against Pathogenic Intestinal Bacteria: Chemical Characterization, In Vitro Tests, and In Vivo Evaluation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, p. 1-10, 2017.
 11. PICARELLI, MARIA MERCEDES ; DANZMANN, LUIZ CLÁUDIO ; **GRUN, LUCAS KICH** ; JÚNIOR, NEVTON TEIXEIRA ROSA ; LAVANDOVSKY, PATRÍCIA ; GUMA, FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES ; STEIN, RENATO T. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; JONES, MARCUS HERBERT . Arterial stiffness by oscillometric device and telomere length in juvenile idiopathic arthritis with no cardiovascular risk factors: a cross-sectional study. *Pediatric Rheumatology*, v. 15, p. 15, 2017.
 12. BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; PARISI, MARIANA M. ; PANIZZUTTI, BRUNA S. ; FRIES, GABRIEL R. ; **GRUN, LUCAS K.** ; GUMA, FÁTIMA T. ; KAPCZINSKI, FLÁVIO ; BERK, MICHAEL ; GAMA, CLARISSA S. ; ROSA, ADRIANE R. . Analyzing leukocyte telomere length in bipolar disorder: Authors? reply. *REVISTA BRASILEIRA DE PSQUIATRIA*, v. 39, p. 275-276, 2017.
 13. CZEPIELEWSKI, LETICIA SANGUINETTI ; MASSUDA, RAFFAEL ; PANIZZUTTI, BRUNA ; DA ROSA, EDUARDA DIAS ; DE LUCENA, DAVID ; MACÊDO, DANIELLE ; **GRUN, LUCAS KICH** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARÍA ; GAMA, CLARISSA SEVERINO . Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *SCHIZOPHRENIA RESEARCH*, v. 174, p. 39-42, 2016.
 14. BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; PARISI, MARIANA M. ; PANIZZUTTI, BRUNA S. ; FRIES, GABRIEL R. ; **GRUN, LUCAS K.** ; GUMA, FÁTIMA T. ; KAPCZINSKI, FLÁVIO ; BERK, MICHAEL ; GAMA, CLARISSA S. ; ROSA, ADRIANE R. . Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease. *REVISTA BRASILEIRA DE PSQUIATRIA*, v. 38, p. 281-286, 2016.
 15. MUNDSTOCK, EDUARDO ; SARRIA, EDGAR E. ; ZATTI, HELEN ; MATTOS LOUZADA, FERNANDA ; **KICH GRUN, LUCAS** ; HERBERT JONES, MARCUS ; GUMA, FÁTIMA T.C.R. ; MAZZOLA IN MEMORIAM, JOÃO ; EPIFANIO, MATIAS ; STEIN, RENATO T. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; MATTIELLO, RITA . Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity*, v. 23, p. 2165-2174, 2015.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1. **GRUN, L. K.**; ROSA JUNIOR, N. T. ; MENGDEN, L. V. ; DE BASTIANI, MARCO ANTÔNIO ; PARISI, MARIANA M. ; BORTOLIN, RAFAEL ; LAVANDOSKI, P. ; PIERDONA, V. ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; JONES, MARCUS HERBERT ; KLAMT, FÁBIO ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA . TRF1 dysregulation is critical for telomere shortening in obesity. In: 1st Workshop on Immunosenescence, 2018, PORTO ALEGRE. TRF1 DYSREGULATION IS CRITICAL FOR TELOMERE SHORTENING IN OBESITY, 2018.
2. **GRUN, L. K.**; ROSA JUNIOR, N. T. ; MENGDEN, L. V. ; BASTIANI, M. A. ; PARISI, MARIANA M. ; BORTOLIN, R. C. ; LAVANDOSKI, PATRÍCIA ; PIERDONA, V. ; ALVES, LETÍCIA BISCAINO ; MOREIRA, J. C. F. ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; JONES, M. H. ; KLAMT, FÁBIO ; PADOIN, A. ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA . TRF1 is a major contributor for telomere shortening in the context of obesity. In: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018, São Paulo. XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018.
3. MENGDEN, L. V. ; BASTIANI, M. A. ; **GRUN, L. K.** ; ARRUDA, L. ; LINK, C. A. ; POZZER, M. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; KLAMT, F. . Cumulus cells GPX4 expression levels are higher in patients with successful embryo implantation. In: 34th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 2018, Barcelona. 34th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, 2018.
4. PIERDONA, V. ; **GRUN, L. K.** ; MOTTIN, CLÁUDIO CORÁ ; PADOIN, ALEXANDRE VONTOBEL ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA . TERT and obesity: Evaluation of expression, methylation and genetic context. In: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018, São Paulo. XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018.
5. **GRUN, L. K.**. Telomere length and its association with inflammation in mental disorders: evidence for accelerated aging. In: Telomeres in health, aging and disease, São Paulo, Botucatu, 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. **GRUN, L. K.**; ROSA JUNIOR, N. T. ; PARISI, M. M. ; MENGDEN, L. V. ; LAVANDOSKI, P. ; BORTOLIN, R. C. ; PIERDONA, V. ; ALVES, L. B. ; PADOIN, A. ; MOTTIN, C. C. ; MATTIELO, R. ; JONES, M. H. ; MOREIRA, J. C. F. ; KLAMT, F. ; Guma, F. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Telomere homeostasis, Shelterin components and dyskerin 1 dysregulation in PBMC from individuals with obesity and its relation to pro-oxidative and pro-inflammatory status. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos do Jordão. Telomere homeostasis, Shelterin components and dyskerin 1 dysregulation in PBMC from individuals with obesity and its relation to pro-oxidative and pro-inflammatory status, 2017.
7. PARISI, M. M. ; **GRUN, L. K.** ; LAVANDOSKI, P. ; PIERDONA, V. ; ROSA, H. ; MOREIRA, J. C. F. ; MOTTIN, C. C. ; KLAMT, F. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. ; Guma, F. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Impaired DNA damage repair and augmented apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells from individuals with obesity. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos do Jordão. Impaired DNA damage repair and augmented apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells from individuals with obesity, 2017.
8. LAVANDOSKI, P. ; PARISI, MARIANA M. ; **GRUN, L. K.** ; ALVES, L. B. ; BRISTOT, IVI JULIANA ; MATTIELO, R. ; MOTTIN, C. C. ; KLAMT, F. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. ; Guma,

- F. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos do Jordão. Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation, 2017.
9. PIERDONA, V. ; **GRUN, L. K.** ; PITREZ, P. M. C. ; PARISI, MARIANA M. ; LAVANDOSKI, P. ; MATTIELO, R. ; Guma, F. C. R. ; PINTO, L. A. ; STEIN, R. T. ; JONES, M. H. ; BARBE-TUANA, F. M. . Children with severe asthma present shorter telomeres, an Indicative of accelerated aging. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos do Jordão. Children with severe asthma present shorter telomeres, an Indicative of accelerated aging, 2017.
 10. GRUN, L. K. ; PICARELLI, M. M. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; LAVANDOSKI, P. ; DANZMANN, L. C. ; Guma, F. C. R. ; STEIN, R. T. ; JONES, M. H. ; BARBE-TUANA, F. M. . Shorter telomeres in juvenile idiopathic Arthritis patients and its relation with arterial Stiffness. In: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal. 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016.
 11. MORAES, K. S. ; OLIVEIRA, C. M. ; MEIRA, L. A. ; ILHA, M. ; **GRUN, L. K.** ; ROSA JUNIOR, N. T. ; BARBE-TUANA, F. M. ; GUMA, F.C. R. . Resveratrol estimula a liberação de fator de necrose tumoral- α , interleucina-6. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre. Resveratrol estimula a liberação de fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, 2016.
 12. BARBE-TUANA, F. M. ; ALVES, L. B. ; **GRUN, L. K.** ; STAPENHORST, F. ; PARISI, M. M. ; LAVANDOSKI, P. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; MATTIELO, R. ; Guma, F. C. R. ; KLAMT, F. ; MOTTIN, C. C. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. . Telomere shortening and mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from morbid obese patients. In: Cold Spring Harbor Laboratory Telomeres & Telomerase Meeting, 2015, New York. Telomere shortening and mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from morbid obese patients, 2015.
 13. **GRUN, L. K.** ; PITREZ, P. M. C. ; PARISI, M. M. ; MATTIELO, R. ; Guma, F. C. R. ; PINTO, L. A. ; STEIN, R. T. ; JONES, M. H. ; BARBE-TUANA, F. M. . Shorter telomeres in severe asthmatic children. In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.
 14. PARISI, M. M. ; FRIES, G. R. ; PANIZZUTTI, B. S. ; **GRUN, L. K.** ; Guma, F. C. R. ; KAPCZINSKY, F. ; GAMA, C. S. ; ROSA, A. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Short telomeres in subjects with remitted bipolar disorder. In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.
 15. LAVANDOSKI, P. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; **GRUN, L. K.** ; ALVES, L. B. ; STAPENHORST, F. ; PARISI, M. M. ; MATTIELO, R. ; Guma, F. C. R. ; KLAMT, F. ; MOTTIN, C. C. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. ; BARBE-TUANA, F. M. . Telomere shortening and high-resolution respirometry in Peripheral blood mononuclear cells from patients with Morbid obesity. In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.
 16. **GRUN, L. K.** ; PITREZ, P. M. C. ; PARISI, M. M. ; MATTIELO, R. ; Guma, F. C. R. ; PINTO, L. A. ; STEIN, R. T. ; JONES, M. H. ; BARBE-TUANA, F. M. . Encurtamento de telômeros em crianças portadoras de asma severa. In: 35ª Semana Científica do HCPA, 2015, Porto Alegre. 35ª Semana Científica do HCPA, 2015.

ORIENTAÇÕES DE ALUNOS DE ENSINO MÉDIO

1. Carolina Mello; Eduarda Ferreira; Maria Júlia Repiso. É possível indicar a idade biológica de pessoas saudáveis através dos telômeros? 2018. Orientação de outra natureza - INSTITUICAO EDUCACIONAL SAO JUDAS TADEU. Orientador externo: **Lucas Kich Grun**.
2. Eduarda Ferreira; Maria Júlia Repiso. A exposição à um ambiente inflamatório crônico induz a morte de células tronco mesenquimais? 2019. Orientação de outra natureza - INSTITUICAO EDUCACIONAL SAO JUDAS TADEU. Orientador externo: **Lucas Kich Grun**