UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eduarda Nabinger

ORIENTADOR

Prof. Lucas Rosa Fraga, PhD.

Porto Alegre, RS

2026

EDUARDA NABINGER

COMPRIMENTO TELOMÉRICO E SUA POTENCIAL RELAÇÃO COM PERDAS GESTACIONAIS DE REPETIÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Porto Alegre, RS.

2026

CIP - Catalogação na Publicação

Nabinger, Eduarda
COMPRIMENTO TELOMÉRICO E SUA POTENCIAL RELAÇÃO COM PERDAS GESTACIONAIS DE REPETIÇÃO / Eduarda Nabinger. -- 2026.
65 f.
Orientador: Lucas Rosa Fraga.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Telômero. 2. Infertilidade. 3. Senescência Celular. 4. Aborto Habitual. I. Rosa Fraga, Lucas, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EDUARDA NABINGER

COMPRIMENTO TELOMÉRICO E SUA POTENCIAL RELAÇÃO COM PERDAS GESTACIONAIS DE REPETIÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: 20 de 03 de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Drª. Patricia Ashton Prolla - UFRGS

Drª Fernanda Sales Luiz Vianna - UFRGS

Drª Paula Barros Terraciano - UFRGS

Dr. Eduardo Pandolfi Passos - UFRGS

"(...) mas numa busca científica, há alimento contínuo para a descoberta e o maravilhamento."

Mary Shelley.

Agradecimentos

Esse trabalho é fruto de muita dedicação e esforço conjunto. Muitas mãos contribuíram para que ele fosse realizado e muitos agradecimentos são necessários.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, pelo apoio e incentivo desde a infância, por me inspirarem a nunca desistir. Aos meus irmãos, Gustavo e Laura, tia Vanessa, minhas avós, família e a todos os amigos, obrigada pelo suporte e momentos de escape da rotina, por estarem perto e presentes mesmo estando longe.

Ao meu orientador, Prof Lucas Rosa Fraga, obrigada por todos os ensinamentos desde a graduação e pela confiança para seguir com esse trabalho. À Prof Clévia Rosset e à doutoranda Luiza pelas diversas reuniões e auxílio durante todas as etapas.

À Alessandra, por ser amiga e colega de profissão, por todos os conselhos e por ser uma inspiração na pesquisa científica.

Agradeço à todas as colegas e amigas da Reprodução Humana, Catharina, Mariana, Gabriella, Giovanna, Norma, Gerta, Renata, Tábata, Caroline e Júlia, por serem uma parte importante e fundamental desses últimos dois anos.

À todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Aos alunos Mariléa, Arthur e Lucas por toda ajuda e explicações.

Agradeço a todas as pacientes por aceitarem participar desse estudo. Ao Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por possibilitarem a execução desse trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Perdas gestacionais de repetição (PGR) são caracterizadas como duas ou mais perdas gestacionais espontâneas, afetando de 1 a 2% dos casais em idade reprodutiva. Diversos fatores estão associados com a etiologia das PGR, como idade materna, fatores anatômicos e fatores endócrinos, porém em cerca de metade dos casos ela permanece desconhecida. Telômeros são sequências de DNA não codificantes encontradas nas extremidades cromossômicas e atuam de maneira a manter a estabilidade genômica e replicativa das células. Telômeros encurtam durante as divisões celulares até atingirem um tamanho em que não conseguem exercer suas funções protetoras aos cromossomos. O encurtamento telomérico tem sido associado a desfechos reprodutivos adversos, incluindo perdas gestacionais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar o comprimento telomérico de mulheres com e sem histórico de PGR através de um estudo caso-controle. Ainda, foram analisados dados clínicos e demográficos das pacientes. Primeiramente, foi realizada a adaptação de um protocolo de análise do comprimento telomérico por qPCR em tempo real. Em seguida, o comprimento telomérico de cada paciente foi estimado a partir da reação de qPCR. A análise evidenciou que o grupo PGR possuía comprimento telomérico significativamente menor que as pacientes do grupo controle (0,997 ± 0,748 e 1,630 ± 1,287, respectivamente; $p<0,01$). Ainda, pacientes do grupo PGR apresentavam idade ao recrutamento significativamente menor (32,64 ± 5,37 anos) quando comparado com o grupo controle (39,49 ± 4,51 anos; $p<0.001$). Dessa forma, esses resultados evidenciam uma relação independente entre encurtamento telomérico e a idade das pacientes. A partir dessas análises destaca-se a associação entre o encurtamento telomérico e as PGR. Assim, esses resultados colaboram para o maior entendimento da relação entre a homeostase telomérica e desfechos reprodutivos adversos e evidenciam a possibilidade da utilização da avaliação do comprimento telomérico como um potencial biomarcador para PGR. Entretanto, mais estudos nesta área são necessários para dar continuidade ao entendimento desta possível relação.

Palavras-chave: infertilidade; perda gestacional; senescência celular; envelhecimento celular; comprimento telomérico.

ABSTRACT

Recurrent pregnancy loss (RPL) is characterized as two or more spontaneous pregnancy losses, affecting 1 to 2% of couples of reproductive age. Several factors are associated with the etiology of RPL, such as maternal age, anatomical and endocrine factors; however, in about half of the cases, it remains unknown. Telomeres are non-coding DNA sequences found at the chromosome ends that act to maintain the genomic and replicative stability of cells. Telomeres shorten during cell division until they can no longer perform their protective functions for chromosomes. Telomere shortening has been associated with adverse reproductive outcomes, including pregnancy loss. In this context, the objective of this study was to analyze and compare the telomere length of women with and without a history of RPL through a case-control study. Furthermore, clinical and demographic data of the patients were analyzed. First, a protocol for analyzing telomere length using real-time qPCR was adapted. Then, the telomere length of each patient was estimated through the qPCR reaction. The analysis showed that women in the RPL group had shorter telomeres than controls (0.997 ± 0.748 and 1.630 ± 1.287, respectively; $p<0.01$). In addition, RPL patients presented lower mean age at recruitment (32.64 ± 5.37 years) when compared to the control group (39.49 ± 4,51 years; $p<0.001$). These results evidenced an independent association between TL and patients' age in these groups. Based on these results, a relationship between telomere shortening and RPL was suggested. Therefore, these results contribute to a greater understanding of the relation of telomere homeostasis and adverse reproductive outcomes, and highlight the possibility of using telomere length assessment as a potential biomarker for RPL. However, further studies in this area are needed to better understand this relationship.

Keywords: infertility; pregnancy loss; cellular senescence; cellular aging; telomere length.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos telômeros e do complexo protetor (Sheltering).

Figura 2: Ação do encurtamento telomérico e dano ao DNA na ativação da resposta a danos ao DNA (DDR).

Figura 3: Influência da ação e inativação da telomerase no comprimento telomérico.

Figura 4: Marco conceitual.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia de busca empregada na revisão sistematizada da literatura.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDR	Resposta de dano ao DNA (do inglês, *DNA Damage Response*)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
DSB	Quebra de fita dupla (do inglês, *Double Strand Break*)
ESHRE	*European Society of Human Reproduction and Embryology*)
MeSH	*Medical Subject Headings*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
PGR	Perdas gestacionais de repetição
POT1	Proteína 1 de Proteção dos Telômeros
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)
RPL	*Recurrent pregnancy loss*
RAP1	Repressor/Ativador da Proteína 1
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TIN2	Proteína 2 de Interação com TRF1
TPP1	Proteína de Interação com TIN2 e POT1
TRF1	Fator de Repetição Telomérico 1
TRF2	Fator de Repetição Telomérico 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**

2 REVISÃO DA LITERATURA **14**

2.1 Estratégia para localizar e selecionar as informações **14**

2.2 Perda gestacional de repetição **14**

2.3 Comprimento telomérico **16**

2.4 Telômeros, Senescência Celular e Reprodução Humana **20**

3 MARCO CONCEITUAL **22**

4 JUSTIFICATIVA **23**

5 OBJETIVOS **24**

5.1 Objetivo primário **24**

5.2 Objetivos secundários **24**

6 REFERÊNCIAS **25**

7 ARTIGOS **29**

7.1 Artigo 1 **29**

7.2 Artigo 2 **44**

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS **62**

9 PERSPECTIVAS FUTURAS **63**

10 ANEXOS **64**

10.1 Anexo I - Carta de aprovação do projeto **64**

10.2 Anexo II - Checklist STROBE **65**

1 INTRODUÇÃO

Perdas gestacionais são reconhecidas como a perda do embrião ou feto antes que ele atinja a viabilidade e podem ocorrer tanto como um evento isolado quanto de maneira recorrente (Bender Atik et al., 2023). De acordo com a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (*European Society of Human Reproduction and Embryology* – ESHRE) perdas gestacionais de repetição (PGR) são caracterizadas como duas ou mais perdas gestacionais espontâneas e afetam entre 1-2% dos casais em idade reprodutiva. Muitos fatores têm sido associados com as PGR, como fatores anatômicos femininos, doenças autoimunes e alterações hormonais e genéticas (Arias-Sosa et al., 2018). Porém, em cerca de metade dos casos, a etiologia das perdas gestacionais permanece desconhecida (Ford, Schust, 2009). Assim, é necessário a busca por possíveis mecanismos e fatores de risco associados com as PGR.

Telômeros são sequências de DNA não codificantes formados por repetições TTAGGG. São encontrados nas extremidades cromossômicas, atuando de maneira a manter a estabilidade genômica e replicativa das células (Frias *et al.*, 2012; Herrmann et al., 2018; Turner, Vasu, Griffin, 2019). Durante as divisões celulares, a DNA polimerase não é capaz de replicar completamente as extremidades dos cromossomos, dessa forma, resultando em uma diminuição progressiva do comprimento dos telômeros a cada divisão (Hiyama, Hiyama, 2007; Smith, Pendlebury, Nandakumar, 2020). Assim, as células passam por um número finito de divisões antes que o comprimento telomérico atinja níveis críticos e percam seu efeito protetor, levando à senescência ou morte celular (Frias et al., 2012). Dessa forma, o encurtamento dos telômeros possui um perfil progressivo em relação a idade, estando assim principalmente relacionado com o envelhecimento (Arsenis et al., 2017). Porém, outros fatores como gênero, prática de atividade física, consumo de álcool, níveis de estresse e fatores genéticos podem influenciar o comprimento telomérico (Frias et al., 2012; Herrmann et al., 2018; Turner, Vasu, Griffin, 2019).

Nesse sentido, alguns estudos anteriores demonstraram uma relação entre a diminuição do comprimento dos telômeros de forma prematura com desfechos reprodutivos adversos e perdas gestacionais de repetição (Pirzada et al., 2019). Porém, os resultados disponíveis ainda são contraditórios, evidenciando a necessidade de maiores estudos dessa relação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégia para localizar e selecionar as informações

Uma revisão sistematizada da literatura foi realizada para apresentar os dois temas principais deste projeto: perdas gestacionais de repetição (PGR) e telômeros. A busca foi realizada a partir do banco de dados Pubmed através dos descritores MeSH e termos livres na base de dados MeSH do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), como descrito na Tabela 1. Ainda, foram incluídos artigos científicos e diretrizes clínicas por conveniência relacionados ao tema, independentemente da estratégia de busca sistematizada.

Conceitos	Termos MeSH	Termos Livres	Termos MeSH + Termos Livre
Recurrent Pregnancy Loss	Abortion, Habitual[mh]	Habitual Abortion[tw] Habitual Abortions[tw] Recurrent Early Pregnancy Loss[tw] Abortion, Recurrent[tw] Recurrent abortion[tw] Recurrent abortions[tw] Miscarriage, Recurrent[tw] Recurrent miscarriage[tw] Recurrent miscarriages[tw]	(Abortion, Habitual[mh] OR Habitual Abortion[tw] OR Habitual Abortions[tw] OR Recurrent Early Pregnancy Loss[tw] OR Abortion, Recurrent[tw] OR Recurrent abortion[tw] OR Recurrent abortions[tw] OR Miscarriage, Recurrent[tw] OR Recurrent miscarriage[tw] OR Recurrent miscarriages[tw])
Telomere	Telomere[mh]	Telomeres[tw]	(Telomere[mh] OR Telomeres[tw])
Estratégia de busca			**Resultados**
(Abortion, Habitual[mh] OR Habitual Abortion[tw] OR Habitual Abortions[tw] OR Recurrent Early Pregnancy Loss[tw] OR Abortion, Recurrent[tw] OR Recurrent abortion[tw] OR Recurrent abortions[tw] OR Miscarriage, Recurrent[tw] OR Recurrent miscarriage[tw] OR Recurrent miscarriages[tw]) AND (Telomere[mh] OR Telomeres[tw])			29 artigos

Tabela 1: Estratégia de busca empregada na revisão sistematizada da literatura.

2.2 Perda gestacional de repetição

Uma perda gestacional é reconhecida como a perda do embrião ou feto antes que ele atinja a viabilidade e é delineada como uma gravidez inviável com um saco gestacional vazio ou contendo um embrião ou feto sem atividade cardíaca nas primeiras 24 semanas de gestação (Bender Atik *et al.*, 2023). Perdas gestacionais podem ocorrem em todos os trimestres, porém cerca de 80% delas ocorrem no primeiro trimestre da gestação (ACOG, 2018; Wilcox et al., 1988). Estima-se que aproximadamente 50% das perdas sejam pré-clínicas, ou seja, acontecem antes da implantação embrionária ou do período menstrual perdido, não sendo clinicamente detectadas. Estima-se também que cerca de 15% das gestações clinicamente reconhecidas evoluam para uma perda gestacional, e que esses números variem de acordo com a idade materna (Larsen *et al.*, 2013; Ramos *et al.,* 2023)**.**

Uma perda gestacional pode acontecer tanto de maneira isolada quanto repetida. As diretrizes da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (*European Society of Human Reproduction and Embryology* – ESHRE) define que o diagnóstico de perdas gestacionais de repetição (PGR) pode ser considerado a partir de duas ou mais perdas gestacionais espontâneas. Estima-se que as PGR afetem cerca de 1 a 2% dos casais em idade reprodutiva, porém determinar a prevalência de PGR possui desafios, principalmente relacionados a perdas pré-clínicas, a população em estudo e fatores sociais e culturais. Assim, as taxas conhecidas podem ser subestimadas (Dimitriadis *et al.*, 2020; Ford, Schust, 2009).

Efeitos físicos, psicológicos e financeiros estão associados às perdas gestacionais de repetição. Pacientes com histórico de perdas gestacionais possuem aumento do risco para nascimentos prematuros em gestações subsequentes, placentação anormal, restrições do crescimento fetal e complicações perinatais (Quenby *et al.*, 2021). Em termos psicológicos, casais enfrentando casos de PGR, em específico as mulheres, possuem aumento de risco para desenvolvimento de quadros de ansiedade e depressão (Voss *et al.*, 2020). Além disso, impactos financeiros envolvem procedimentos médicos, como cirurgias e tratamentos, e perda de produtividade no trabalho, afetando os indivíduos afetados, os sistemas de saúde e a sociedade (Quenby *et al.*, 2021).

Com relação à etiologia, as causas das perdas gestacionais variam de acordo com a idade materna e gestacional. Diversos fatores estão associados com as PGR, como alterações na anatomia do sistema reprodutor feminino, condições autoimunes, fatores endócrinos, além de fatores ambientais como poluição e consumo de álcool. (Arias-Sosa *et al.*, 2018; Ford, Schust, 2009; Quenby *et al.*, 2021). Entretanto, em cerca da metade dos casos as PGR permanecem sem uma causa definida. Ademais, diversos estudos reportam o papel de fatores genéticos nas PGR, como anormalidades cromossômicas do casal, metilação alterada de DNA, fragmentação do DNA espermático e variantes genéticas (Larsen *et al.*, 2013; Turesheva *et al.*, 2023).

A partir do exposto, entende-se a necessidade do entendimento e estudo da etiologia e fatores de risco para as perdas gestacionais idiopáticas, buscando a possibilidade de diagnóstico e tratamento dessa condição. Visto as evidências já presentes na literatura e as lacunas que ainda existem no entendimento da causa das PGR, a busca por biomarcadores e análise de fatores moleculares envolvidos em processos gestacionais ficam em destaque.

2.3 Comprimento telomérico

Telômeros são formados por repetições TTAGGG, sequências de DNA não codificantes, e associados com proteínas formando um complexo de proteção ao cromossomo (Frias *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2018) (Figura 1). Os telômeros se localizam nas extremidades cromossômicas e atuam de maneira a manter a estabilidade genômica e replicativa das células (Herrmann *et al.*, 2018; Turner, Vasu, Griffin, 2019). Seis proteínas compõem esse complexo: TRF1 e TRF2 (Fator de Repetição Telomérico 1 e 2), RAP1 (Repressor/Ativador da Proteína 1), TIN2 (Proteína 2 de Interação com TRF1), TPP1 (Proteína de Interação com TIN2 e POT1) e POT1 (Proteína 1 de Proteção dos Telômeros) (Herrmann *et al.*, 2018; Zhu *et al*., 2019).

O DNA telomérico é formado por fita dupla em sua maioria, com uma pequena região de fita simples rica em guanina na extremidade 3'. Com o suporte do complexo proteico, essa fita simples pode dobrar e anelar com a fita dupla do DNA telomérico, assim formando um "laço" (*loop*), conhecido como *T-loop* (Zhu *et al*., 2019) (Figura 1). A formação do *T-loop*, está principalmente associado com a proteção da região 3' livre dos telômeros, evitando que ela seja reconhecida como uma quebra de fita dupla (*double strand break*, DSB) (Zhu *et al*., 2019). Assim, o complexo, em conjunto com o *T-loop*, está envolvido na proteção das extremidades cromossômicas, prevenindo recombinações não desejadas e a sua degradação (Herrmann *et al.*, 2018).

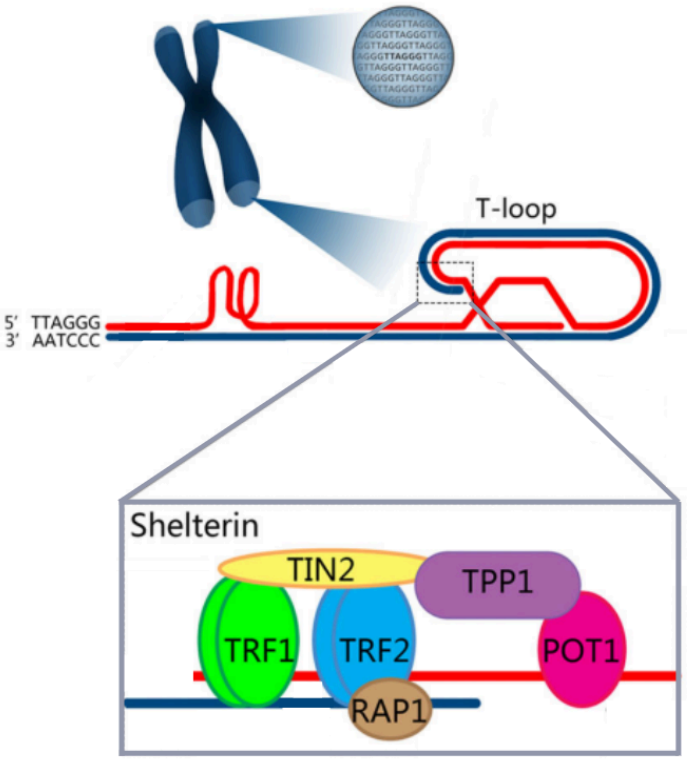


Figura 1: **Estrutura dos telômeros e do complexo protetor (*Sheltering*)** (Adaptado de Zhu *et al*., 2019).

Durante a divisão celular, o DNA é duplicado por replicações semiconservativas, em que cada fita da dupla fita de DNA serve como um molde para a produção da fita complementar, e dessa forma a replicação acontece em apenas uma direção 5' - 3' pela ação da DNA polimerase (Giardini *et al.*, 2014). Porém, a DNA polimerase é incapaz de replicar completamente as extremidades cromossômicas, resultando em uma diminuição progressiva do comprimento dos telômeros a cada divisão celular (Hiyama, Hiyama, 2007; Smith, Pendlebury, Nandakumar, 2020). Dessa forma, com o passar dos ciclos celulares os telômeros encurtam e se tornam disfuncionais, e assim ativam uma resposta de dano ao DNA (*DNA damage response* - DDR) (Muraki, Murnane, 2017; Shreeya et al., 2024) (Figura 2). Como consequência da DDR, ocorre ativação das vias do p53 e pRb, levando a indução de senescência celular ou apoptose (Figura 3) (Frias *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2018).

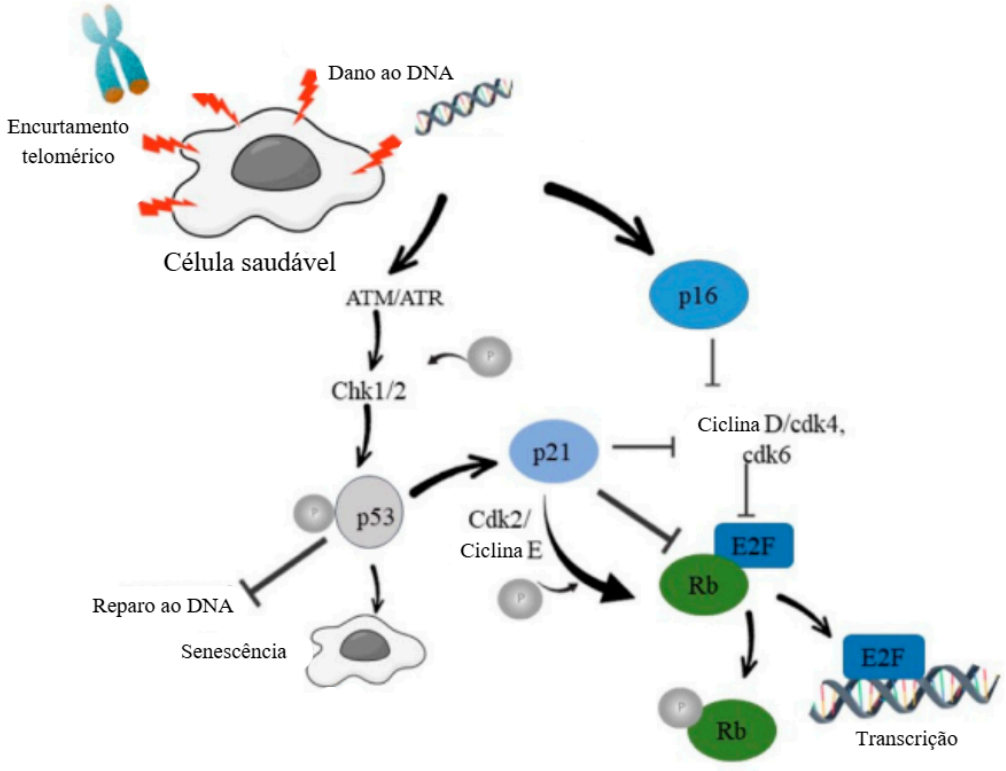


Figura 2: Ação do encurtamento telomérico e dano ao DNA na ativação da resposta a danos ao DNA (DDR). Diagrama esquemático mostrando a influência do DDR na indução a parada do ciclo celular e a senescência (Adaptado de Shreeya et al., 2024).

Alguns tipos celulares, como células endometriais, germinativas e diversos tumores, evitam o encurtamento dos seus telômeros pela ação da telomerase, uma enzima com atividade de transcriptase reversa que adiciona repetições teloméricas (Figura 3) (Turner, Vasu, Griffin, 2019; Zhu *et al.*, 2019). Para estender os telômeros, a telomerase se liga à região 3’ do DNA e usa um molde de RNA interno para uma reação de transcrição reversa catalisada por TERT (Transcriptase Reversa da Telomerase) (Zhu *et al*., 2019). Porém, células somáticas não possuem alta expressão de telomerase, e dessa forma, passam por um número finito de divisões antes que o comprimento telomérico atinja níveis críticos e percam seu efeito protetor (Frias *et al.*, 2012; Muraki *et al*., 2012; Zvereva, Shcherbakova, Dontsova, 2010).

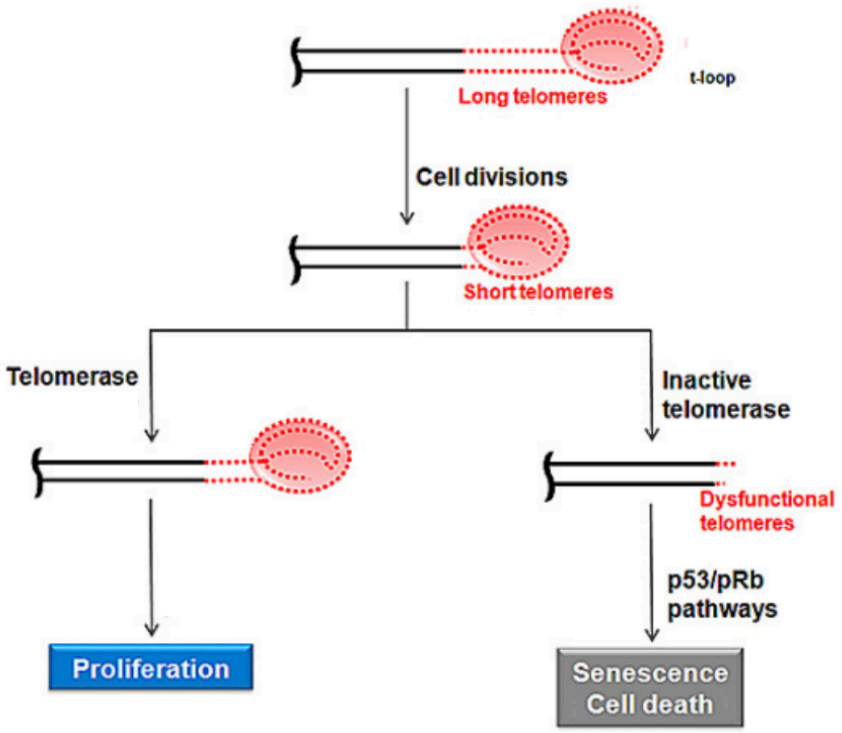


Figura 3: Influência da ação e inativação da telomerase no comprimento telomérico (Adaptado de Frias *et al*., 2012).

O encurtamento dos telômeros possui um perfil progressivo em relação a idade, estando assim principalmente relacionado com o envelhecimento (Arsenis *et al.*, 2017). Telômeros diminuídos e alteração na expressão de telomerase foram associados previamente com doenças relacionadas com o envelhecimento, como Alzheimer e osteoporose (Gao *et al.*, 2022). Porém, outros fatores como gênero, prática de atividade física, consumo alcoólico, níveis de estresse e fatores genéticos podem influenciar o comprimento telomérico (Frias *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2018; Turner, Vasu, Griffin, 2019). A exemplo, um nível alto de estrogênio está associado com aumento da atividade da telomerase, fazendo com que mulheres possuam telômeros maiores em comparação com homens.

Diferentes linhagens celulares e tecidos possuem diferentes padrões de expressão de telomerase, e consequentemente, padrões de comprimento telomérico diferentes. Dessa forma, um mesmo indivíduo pode apresentar seu comprimento telomérico relativo variado dependendo da origem do DNA analisado (Goldman *et al*., 2018; Lin *et al.*, 2019). Estudos que realizaram análise telomérica com diferentes tecidos apontam para uma correlação do comprimento dos telômeros em leucócitos circulantes e células de músculos intercostais e hepáticas, porém foram descritas diferenças quando comparado telômeros de sangue periférico e células da mucosa oral (Bhattacharya; Bhaumik; Kumar-Dey, 2019; Dlouha *et al*.,

2014). Apesar da literatura disponível, mais estudos são necessários para melhor elucidação da correlação do comprimento telomérico em diferentes tecidos.

2.4 Telômeros, Senescência Celular e Reprodução Humana

O encurtamento telomérico pode levar as células a entrarem em processo de senescência. Senescência celular é definida como um estado em que a célula perde sua capacidade de divisão, mesmo quando estimulada com fatores de crescimento (Hayflick, 1965). Essas células apresentam alterações morfológicas características, como aumento do tamanho e alterações nucleares, porém mantendo sua viabilidade e atividade metabólica (Hernandez-Segura, Nehme, Demaria, 2018; Mohamad Kamal et al., 2020). Essas células possuem um papel pleiotrópico antagônico no organismo, ou seja, estão associadas a efeitos benéficos e fisiológicos, e a efeitos deletérios aos tecidos e ao indivíduo (Mohamad Kamal et al., 2020). Dentre suas seu impacto em funções fisiológicas, destaca-se o reparo tecidual, controle de infecções e desenvolvimento embrionário e fetal (He; Sharpless, 2017). Entretanto, em um contexto patológico, estão associadas com doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, obesidade, diabetes tipo 2 e proliferação tumoral (Muñoz-Espín et al., 2013).

Células senescentes atuam em diferentes momentos da reprodução humana. Em um contexto fisiológico, células senescentes estão presentes em membranas fetais, estando associadas principalmente com trabalhos de parto a termo. Além disso, a senescência celular está envolvida com decidualização de células endometriais, na receptividade do endométrio e na implantação (Behnia *et al.*, 2015; Menon, Mesiano, Taylor, 2017; Secomandi *et al.*, 2022). A presença de células senescentes é evidente em diversos tecidos durante o desenvolvimento embrionário e fetal durante janelas de tempo específicas (Storer *et al.*, 2013). Dessa forma, demonstram que esse é um processo celular programado que necessita de uma regulação precisa (Rhinn, Ritschka, Keyes, 2019). Nesse contexto, o desenvolvimento da senescência celular de maneira prematura está associada com complicações gestacionais, como nascimentos prematuros, restrição do crescimento fetal e pré-eclâmpsia (Cindrova-Davies *et al.*, 2018).

Dentre os marcadores de senescência avaliados durante a gestação, estudos apontam para telômeros menores em neonatos associados com níveis altos de estresse materno e relação com fatores sociais como maior contato com poluição (Panelli; Bianco, 2022). Em

contraste, os níveis de vitamina D e suplementação com ácido fólico durante a gestação foram associados com telômeros maiores em recém-nascidos (Lis *et al.*, 2023). Ainda, o comprimento telomérico materno está associado com a qualidade oocitária e embrionária (Cheng *et al.*, 2013). Diminuição dos telômeros foi reportado previamente estando relacionado com pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, restrição do crescimento fetal, diminuição da vida reprodutiva, menopausa precoce e perdas gestacionais (Biron-Shental *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2023; Harville *et al.*, 2010).

A literatura disponível evidencia uma possível relação entre o encurtamento telomérico e desfechos reprodutivos adversos. Porém, os resultados disponíveis ainda são contraditórios. Alguns estudos encontraram diminuição do comprimento telomérico em mulheres e casais com histórico de perdas gestacionais de repetição (Onat *et al.*, 2021; Pirzada *et al.*, 2019; Thilagavathi *et al.*, 2013). Em contrapartida, outros estudos não encontraram diferença entre os grupos analisados em relação a PGR ou com a fertilidade feminina (Hapangama *et al.*, 2008; Purdue-Smithe *et al.*, 2021). Dessa forma, a literatura limitada corrobora para a necessidade de mais pesquisas e para o avanço do conhecimento entre os dois processos.

3 MARCO CONCEITUAL

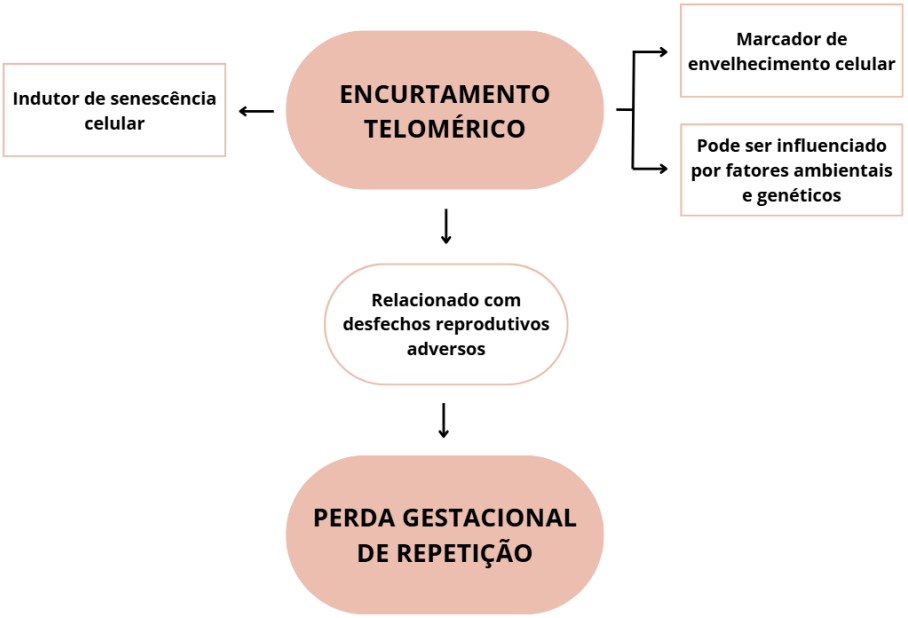


Figura 4: Marco conceitual.

4 JUSTIFICATIVA

As perdas gestacionais de repetição são um desafio para a medicina reprodutiva visto as diferentes etiologias relacionadas e as consequências geradas para o casal afetado. Danos psicológicos e físicos às mulheres que sofrem com as perdas são os principais impactos da condição, além disso, podem envolver danos financeiros tanto para o casal quanto aos sistemas de saúde (Quenby *et al.*, 2021; Voss *et al.*, 2020). Apesar de avanços na pesquisa e na área de reprodução assistida terem auxiliado no manejo e tratamento dessas condições, em cerca de metade dos casos, a etiologia das PGR ainda é desconhecida (Ford, Schust, 2009).

A senescência celular está associada com a fisiologia da reprodução humana. O encurtamento telomérico, um dos principais marcadores dessas células, está associado com o envelhecimento e diminuição da janela reprodutiva em mulheres (Fan *et al.*, 2023). Ainda, diminuição do comprimento dos telômeros de forma prematura foi associado com desfechos reprodutivos adversos e perdas gestacionais de repetição (Pirzada *et al.*, 2019).

Apesar dos indícios da interação entre senescência e a reprodução humana, ainda existem lacunas de conhecimento, principalmente em relação à análise do comprimento telomérico e seu encurtamento. Dessa forma, se mostra essencial a investigação desse processo, de maneira a buscar melhor entendimento da fisiopatologia das perdas gestacionais de repetição e o estudo do comprimento telomérico como um dos seus possíveis biomarcadores.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar a relação entre o comprimento telomérico e perdas gestacionais de repetição através de um estudo caso-controle.

5.2 Objetivos secundários

1. Adaptar e padronizar um protocolo para avaliação do comprimento telomérico utilizando PCR quantitativo em tempo real.
2. Caracterizar e comparar informações clínicas e demográficas de um grupo de mulheres com e sem histórico de perdas gestacionais de repetição.
3. Analisar e comparar o comprimento telomérico de mulheres com e sem histórico de perdas gestacionais de repetição em amostras de DNA extraídas de sangue periférico;

6 REFERÊNCIAS

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS' COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS - GYNECOLOGY. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. **Obstetrics & Gynecology**, [*s. l.*], v. 132, n. 5, p. e197–e207, 2018.

ARIAS-SOSA, Luis Alejandro *et al.* Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [*s. l.*], v. 35, n. 3, p. 355–366, 2018.

ARSENIS, Nicole C. *et al.* Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. **Oncotarget**, [*s. l.*], v. 8, n. 27, p. 45008–45019, 2017.

BHATTACHARYA, Mandar; BHAUMIK, Pranami; KUMAR-DEY, Subrata. Telomere length comparison between oral cells and blood cells among neonates. **The Turkish Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 520–524, 2019.

BEHNIA, Faranak *et al.* Chorioamniotic membrane senescence: A signal for parturition?. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [*s. l.*], v. 213, n. 3, p. 359.e1-359.e16, 2015.

BENDER ATIK, Ruth *et al.* ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. **Human Reproduction Open**, [*s. l.*], v. 2023, n. 1, 2023.

BIRON-SHENTAL, Tal *et al.* Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [*s. l.*], v. 202, n. 4, p. 381.e1-381.e7, 2010.

CHENG, En-Hui *et al.* Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality. **Human reproduction (Oxford, England)**, [*s. l.*], v. 28, n. 4, p. 929–36, 2013.

CINDROVA-DAVIES, Tereza *et al.* Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. **Placenta**, [*s. l.*], v. 68, p. 15–22, 2018.

DIMITRIADIS, Evdokia *et al.* **Recurrent pregnancy loss**. [*S. l.*]: Nature Research, 2020.

DLOUHA, D. et al. Comparison of the Relative Telomere Length Measured in Leukocytes and Eleven Different Human Tissues. **Physiological Research**, [s. l.], p. S343–S350, 2014.

FAN, Gaojie *et al.* Association between female-specific reproductive factors and leukocyte telomere length. **Human Reproduction**, [*s. l.*], v. 38, n. 11, p. 2239–2246, 2023.

FORD, Holly B; SCHUST, Danny J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. **Reviews in obstetrics & gynecology**, [*s. l.*], v. 2, n. 2, p. 76–83, 2009.

FRIAS, Cristina *et al.* Telomere dysfunction and genome instability. **Frontiers in Bioscience**, [*s. l.*], v. 17, n. 7, p. 2181, 2012.

GAO, Xingyu *et al.* Telomeres and Mitochondrial Metabolism: Implications for Cellular Senescence and Age-related Diseases. **Stem Cell Reviews and Reports**, [*s. l.*], v. 18, n. 7, p. 2315–2327, 2022.

GIARDINI, Miriam Aparecida et al. Telomere and Telomerase Biology. In: [S. l.: s. n.], 2014. p. 1–40.

GOLDMAN, Elisabeth A. et al. Evaluating minimally invasive sample collection methods for telomere length measurement. **American Journal of Human Biology**, [s. l.], v. 30, n. 1, 2018.

HAPANGAMA, DK *et al.* Endometrial telomerase shows specific expression patterns in different types of reproductive failure. **Reproductive BioMedicine Online**, [*s. l.*], v. 17, n. 3, p. 416–424, 2008.

HARVILLE, Emily W *et al.* Telomere length, pre-eclampsia, and gestational diabetes. **BMC Research Notes**, [*s. l.*], v. 3, n. 1, p. 113, 2010.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, [*s. l.*], v. 37, n. 3, p. 614–636, 1965.

HE, Shenghui; SHARPLESS, Norman E. Senescence in Health and Disease. **Cell**, [*s. l.*], v. 169, n. 6, p. 1000–1011, 2017.

HERNANDEZ-SEGURA, Alejandra; NEHME, Jamil; DEMARIA, Marco. Hallmarks of Cellular Senescence. **Trends in Cell Biology**, [*s. l.*], v. 28, n. 6, p. 436–453, 2018.

HIYAMA, E; HIYAMA, K. Telomere and telomerase in stem cells. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 96, n. 7, p. 1020–1024, 2007.

HERRMANN, Markus *et al.* Telomere biology and age-related diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, [*s. l.*], v. 56, n. 8, p. 1210–1222, 2018.

LARSEN, Elisabeth Clare *et al.* New insights into mechanisms behind miscarriage. **BMC Medicine**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. 154, 2013.

LIN, Jue et al. Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 99, p. 271–278, 2019.

LIS, Nikoletta *et al.* Preterm Birth and Its Association with Maternal Diet, and Placental and Neonatal Telomere Length. **Nutrients**, [*s. l.*], v. 15, n. 23, p. 4975, 2023.

MENON, Ramkumar; MESIANO, Sam; TAYLOR, Robert N. Programmed Fetal Membrane Senescence and Exosome-Mediated Signaling: A Mechanism Associated With Timing of Human Parturition. **Frontiers in Endocrinology**, [*s. l.*], v. 8, 2017.

MOHAMAD KAMAL, Nor Shaheera *et al.* Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. **European Journal of Cell Biology**, [*s. l.*], v. 99, n. 6, p. 151108, 2020.

MUÑOZ-ESPÍN, Daniel *et al.* Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. **Cell**, [*s. l.*], v. 155, n. 5, p. 1104–1118, 2013.

MURAKI, Keiko et al. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. **Frontiers in oncology**, [s. l.], v. 2, p. 135, 2012.

MURAKI, Keiko; MURNANE, John P. The DNA damage response at dysfunctional telomeres, and at interstitial and subtelomeric DNA double-strand breaks. **Genes & Genetic Systems**, v. 92, n. 3, p. 135-152, 2017.

ONAT, Taylan *et al.* Telomere Length in Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. **Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie**, [*s. l.*], v. 225, n. 02, p. 119–124, 2021.

PANELLI, Danielle M.; BIANCO, Katherine. Cellular aging and telomere dynamics in pregnancy. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, [*s. l.*], v. 34, n. 2, p. 57–61, 2022.

PIRZADA, Rameez Hassan *et al.* Role of TRF2 and TPP1 regulation in idiopathic recurrent pregnancy loss. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], v. 127, p. 306–310, 2019.

QUENBY, Siobhan *et al.* Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 397, n. 10285, p. 1658–1667, 2021.

RAMOS, José G L et al. Rotinas em Obstetrícia (Rotinas). In: Passos, Eduardo Pandolfi et al. Abortamento. 8. Ed. Porto Alegre: Grupo A, 2023. p. 203-219.

RHINN, Muriel; RITSCHKA, Birgit; KEYES, William M. Cellular senescence in development, regeneration and disease. **Development (Cambridge)**, [*s. l.*], v. 146, n. 20, 2019.

SECOMANDI, Laura *et al.* The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions. **Human Reproduction Update**, [*s. l.*], v. 28, n. 2, p. 172–189, 2022.

SMITH, Eric M.; PENDLEBURY, Devon F.; NANDAKUMAR, Jayakrishnan. Structural biology of telomeres and telomerase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 61–79, 2020.

STORER, Mekayla *et al.* Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. **Cell**, [*s. l.*], v. 155, n. 5, p. 1119–1130, 2013.

THILAGAVATHI, J. *et al.* Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [*s. l.*], v. 30, n. 6, p. 793–798, 2013.

TURESHEVA, Akbayan *et al.* Recurrent Pregnancy Loss Etiology, Risk Factors, Diagnosis, and Management. Fresh Look into a Full Box. **Journal of Clinical Medicine**, [*s. l.*], v. 12, n. 12, p. 4074, 2023.

TURNER, Kara; VASU, Vimal; GRIFFIN, Darren. Telomere Biology and Human Phenotype. **Cells**, [*s. l.*], v. 8, n. 1, p. 73, 2019.

VOSS, Pauline *et al.* Recurrent pregnancy loss: a shared stressor---couple-orientated psychological research findings. **Fertility and Sterility**, [*s. l.*], v. 114, n. 6, p. 1288–1296, 2020.

WILCOX, Allen J. *et al.* Incidence of Early Loss of Pregnancy. **New England Journal of Medicine**, [*s. l.*], v. 319, n. 4, p. 189–194, 1988.

ZHU, Yukun *et al.* Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. **Biogerontology**, [*s. l.*], v. 20, n. 1, p. 1–16, 2019.

ZVEREVA, M. I.; SHCHERBAKOVA, D. M.; DONTSOVA, O. A. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. **Biochemistry (Moscow)**, [*s. l.*], v. 75, n. 13, p. 1563–1583, 2010.

7 ARTIGOS

7.1 Artigo 1

[Conteúdo suprimido]

7.2 Artigo 2

[Conteúdo suprimido]

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho foi possível a adaptação de um protocolo padrão para avaliação do comprimento telomérico em diferentes espécies a partir da técnica de PCR quantitativo em tempo real. O protocolo padronizado foi utilizado para o estudo caso-controle entre pacientes com histórico de perdas gestacionais de repetição e pacientes sem histórico de infertilidade, no qual evidenciou-se a relação entre a diminuição do comprimento telomérico e PGR. Ainda, as análises realizadas demonstraram que as pacientes não possuem um padrão de encurtamento telomérico dependente da idade. Em síntese, nossa análise demonstrou que pacientes com histórico de PGR possuem telômeros significativamente mais curtos que pacientes férteis. Esses resultados colaboram para o maior entendimento da relação entre a homeostase telomérica e desfechos reprodutivos adversos e evidenciam a possibilidade da utilização da avaliação do comprimento telomérico como um potencial biomarcador para PGR.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A literatura disponível ainda é limitada em relação a associação entre telômeros diminuídos e perdas gestacionais. Nossos resultados colaboram para a importância da continuidade do estudo da relação entre comprimento telomérico e desfechos reprodutivos. Como perspectiva, se vê a necessidade de estudos mais amplos, com maior número amostral e avaliação do comprimento telomérico em diferentes tecidos, de maneira a ampliar o conhecimento na área e na utilização da avaliação de telômeros como um possível biomarcador. Ainda, o crescimento da pesquisa na área é necessário para, além de entender a relação entre telômeros e a gestação, buscar os mecanismos envolvidos com o encurtamento telomérico e formas de impedir ou adiar que ocorra de forma prematura.

10 ANEXOS

10.1 Anexo I - Carta de aprovação do projeto.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

DIRETORIA DE PESQUISA

Carta de Aprovação

Projeto

2024/0385

Pesquisadores:

LUCAS ROSA FRAGA

LUIZA PRETTO EDUARDA NABINGER CLÉVIA ROSSET

Número de Participantes: 80

Título: Comprimento Telomérico e Perdas Gestacionais de Repetição: um estudo caso-controle

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final à Diretoria de Pesquisa (DIPE).

23/09/2024

Assinado digitalmente por:
URSULA DA SILVEIRA MATTE
Dipe - DIRETORIA DE PESQUISA
24/09/2024 12:04:15

Impresso do sistema AGHUse-Pesquisa por JORDANA ZANUZO ZIMMERMANN FONTOURA em 23/09/2024 17:00:52

10.2 Anexo II - Checklist STROBE (STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology) for case-control studies.

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of ***case-control studies***

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(*a*) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract
		(*b*) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(*a*) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls
		(*b*) For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(*a*) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding
		(*b*) Describe any methods used to examine subgroups and interactions
		(*c*) Explain how missing data were addressed
		(*d*) If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed
		(*e*) Describe any sensitivity analyses
Results		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
Outcome data	15*	Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
Main results	16	(*a*) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
		(*b*) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		(*c*) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period

1

Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for cases and controls.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at http://www.plosmedicine.org/, Annals of Internal Medicine at http://www.annals.org/, and Epidemiology at http://www.epidem.com/). Information on the STROBE Initiative is available at http://www.strobe-statement.org.