

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**Nevton Teixeira da Rosa Junior**

**Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
*SHELTERIN*, DISQUERINA, CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E COMPRIMENTO  
DOS TELÔMEROS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE**

**Porto Alegre, 2017.**

**Nevton Teixeira da Rosa Junior**

**DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
*SHELTERIN*, DISQUERINA, CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E COMPRIMENTO  
DOS TELÔMEROS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como Requisito Essencial para Obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

**Orientadora: Profa. Dra. Florencia María Barbé-Tuana**

**Coorientadora: Profa. Dra. Fátima T. Costa Rodrigues Guma**

**Porto Alegre, 2017.**

CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira da Rosa Junior, Newton  
DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO  
COMPLEXO SHELTERIN, DISQUERINA, CITOCINAS  
INFLAMATÓRIAS E COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE / Newton  
Teixeira da Rosa Junior. -- 2017.  
86 f.

Orientadora: Florencia María Barbé-Tuana.  
Coorientadora: Fátima T. Costa Rodrigues Guma.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2017.

1. Telômeros. 2. Obesidade. 3. Complexo Shelterin.  
4. Inflamação. 5. Envelhecimento Celular. I. María  
Barbé-Tuana, Florencia, orient. II. T. Costa  
Rodrigues Guma, Fátima, coorient. III. Título.

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

**Nevton Teixeira da Rosa Junior**

**DETERMINAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
*SHELTERIN*, DISQUERINA, CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E COMPRIMENTO  
DOS TELÔMEROS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE**

Dissertação aprovada em 08/03/2017 para obtenção do título de Mestre em  
Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**BANCA EXAMINADORA:**

1. Dr. Daniel P. Gelain: P.P.G. Bioquímica-ICBS/UFRGS (relator);
2. Dra. Ana Paula Duarte de Souza: PPG em Biologia Celular e Molecular e Programa Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da PUCRS;
3. Dra. Francieli Rohden: PNPd do PPG Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS.

## Agradecimentos

Se você está lendo esta página é porque eu consegui alcançar um grande objetivo na minha vida, de concluir um mestrado acadêmico na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Quem fez a graduação em uma universidade particular com bolsa de estudos e com muitas dificuldades financeiras sabe bem como valorizar um mestrado acadêmico em uma universidade federal brasileira. E gostaria, por meio desta página neste documento, agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional durante estes 2 anos de mestrado.

Primeiramente gostaria de agradecer a Professora Regina Maria Vieira da Costa Guaragna por ser uma professora com a capacidade de encantar com seus ensinamentos de bioquímica. Ensinamentos os quais me fizeram decidir por realizar com todo o prazer o mestrado em bioquímica da UFRGS. Lembrando de mim me trouxe para bioquímica onde pude realizar meus objetivos profissionais, sendo este o primeiro passo para a mudança da minha de vida. Muito obrigado professora!

Em segundo lugar gostaria de agradecer também a Professora Fátima Guma a qual me recebeu com toda gentileza do mundo sempre disposta a auxiliar em tudo o que era preciso. Agradeço ainda pelas oportunidades de trabalhar com as turmas de bioquímica do curso de biologia da UFRGS, trabalho realmente enriquecedor. E por todo seu trabalho com sinceridade e bom senso comigo.

Indispensavelmente, gostaria de agradecer a todo auxílio da minha orientadora professora Florencia Barbé-Tuana, a qual me ensinou principalmente como ser crítico com todos processos de desenvolvimento da ciência. E também

agradecer pelas dezenas de horas trabalhando ao meu lado, tanto no laboratório como focada em casa em nossos dados estatísticos e revisões bibliográficas. Espero ter conseguido assimilar pelo menos um décimo das tuas capacidades de pesquisadora, muito obrigado por tudo!

Gostaria de agradecer também a todos meus colegas dos laboratórios (21/310). A Mariana P. por ter iniciativa a me ensinar as metodologias, ao Lucas G. por ter a paciência de me explicar 10 vezes a mesma coisa de biologia molecular, a Patrícia L. por todo auxílio no dia a dia e discussões científicas acirradas, a Gabriela H. pelos ensinamentos de cálculos estequiométricos e todas gentilezas, a Ketlen, a Franciele, Barbara e a Mariana I. por todo carinho e parceria nessa jornada e finalmente ao Cleverson e ao Leo Meira grandes parceiros de ciência e de ensinamentos de vida. Muito obrigado a todos vocês por me suportarem todos estes dias!

Gostaria de agradecer também, o professor relator da minha monografia o professor Daniel Pens Gelain que mesmo em férias aceitou meu trabalho para correção, muito obrigado.

Por fim, mas não menos importante, queria agradecer a minha esposa Karina Isabel Costa, por toda parceria e paciência nestes anos de muito estudo e dedicação. Sem a presença dela dando todo o suporte na minha vida seria muito mais difícil a conclusão deste mestrado. Sogra e sogro também se tornaram minha família e me ajudam muito no dia a dia e tornaram estes anos mais fáceis para mim.

Se esqueci de alguém, desculpem- me. Meu muito obrigado a todos.

## Pensamento de impacto

*Não faço visitas, nem ando em sociedade alguma - nem de salas, nem de cafés. Fazê-lo seria sacrificar a minha unidade interior, entregar-me a conversas inúteis, furtar tempo senão aos meus raciocínios e aos meus projetos, pelo menos aos meus sonhos, que sempre são mais belos que a conversa alheia.*

*Devo-me a humanidade futura. Quando me desperdiçar, desperdiço o divino patrimônio possível dos homens de amanhã; diminuo-lhes a felicidade que lhes posso dar e diminuo-me a mim - próprio, não só aos meus olhos reais, mas aos olhos possíveis de Deus.*

*Isto pode não ser assim, mas sinto que é meu dever crê-lo.*

*Fernando Pessoa*

## Sumário

PARTE I.....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 <i>Obesidade</i> .....	1
1.2 <i>Obesidade associada a inflamação</i> .....	2
1.3 <i>Secreção alterada de mediadores inflamatórios na obesidade</i> .....	3
1.4 <i>Senescência celular associada ao envelhecimento</i> .....	4
1.5 <i>Envelhecimento associado a inflamação: inflammaging</i> .....	5
1.6 Fenótipo secretor associado a senescência (SASP) .....	6
1.7 <i>Estilo de vida e comprimento de telômeros</i> .....	7
1.8 <i>Telômeros</i> .....	8
1.9 <i>Complexo shelterin</i> .....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 <i>Objetivos Gerais</i> .....	19
3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	19
PARTE II.....	20
4. METODOLOGIA .....	21
4.1 <i>Delineamento do estudo</i> .....	21
4.2 <i>População do estudo</i> .....	21
4.2.1 <i>Voluntários alocados ao grupo casos</i> .....	21
4.2.2 <i>Voluntários alocados ao grupo controles</i> .....	21
4.3 <i>Cálculo amostral</i> .....	22
4.4 <i>Coleta de material biológico</i> .....	22
4.5 <i>Técnicas de biologia molecular</i> .....	22
4.5.1 <i>Extração de RNA total</i> .....	22
4.5.2 <i>Síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT- qPCR)</i> ..	23
4.5.3 <i>Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)</i> .....	24
4.5.4 <i>Matriz de oligonucleotídeos iniciadores</i> .....	25
4.5.5 <i>Expressão gênica</i> .....	27



4.6	Análise e documentação em géis de agarose .....	28
4.7	Análise comparativa da expressão relativa pelo método $\Delta\Delta CT$ .....	28
4.8	Testes estatísticos.....	28
4.9	Descarte de resíduos .....	29
4.9.1	Ética.....	29
5.	RESULTADOS.....	31
5.1	Dados demográficos .....	31
5.2	Expressão gênica das proteínas do complexo <i>shelterin</i> e disquerina.....	32
5.3	Perfil de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias .....	37
5.4	Correlação entre genes do complexo <i>shelterin</i> , <i>DKC1</i> , comprimento de telômeros e citocinas inflamatórias.....	39
PARTE III	.....	44
6.	DISCUSSÃO .....	45
PARTE IV	.....	56
7.	CONCLUSÕES.....	57
8.	PERSPECTIVAS .....	58
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
10.	ANEXOS .....	65
CEP UFRGS	.....	66
CEP PUCRS	.....	68
11.	FIGURAS SUPLEMENTARES .....	70
FIGURA SUPLEMENTAR 1	.....	71
FIGURA SUPLEMENTAR 2	.....	73
FIGURA SUPLEMENTAR 3	.....	75
FIGURA SUPLEMENTAR 4	.....	76

## PARTE I

## RESUMO

Nos indivíduos com obesidade, o excesso de tecido adiposo, exerce um papel fundamental induzindo um estado inflamatório crônico e sistêmico. A obesidade mimetiza processos celulares semelhantes aos do envelhecimento tais como a deterioração de tecidos e órgãos e diminuição na capacidade de reparo dos danos induzidos ao DNA. Nesse contexto, as citocinas pró-inflamatórias induzem atritos ao DNA que impactam, principalmente nas regiões mais susceptíveis dos cromossomos, os telômeros. Os telômeros, presentes nas extremidades dos cromossomos, estão associados a um complexo proteico denominado complexo *shelterin*. O complexo *shelterin* é formado por 6 proteínas (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 e RAP1), que junto com proteínas acessórias como a disquerina (DKC1), participam da regulação do comprimento dos telômeros e protegem os cromossomos de atividades indesejadas de erosão enzimática, recombinação não-homóloga e fusão das terminações cromossômicas.

Nos últimos anos, foram estabelecidas relações positivas entre condições patológicas clinicamente diferentes, como as moduladas por inflamação, e o comprimento dos telômeros. Recentemente, nosso grupo demonstrou telômeros encurtados em indivíduos portadores de obesidade mórbida. Assim o objetivo do presente trabalho foi explorar fatores adicionais associados ao metabolismo telomérico, como a expressão gênica das proteínas do complexo *shelterin* e citocinas pró-inflamatórias, as quais podem contribuir para o encurtamento acelerado de telômeros. Utilizamos amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos adultos saudáveis (n = 27) e indivíduos adultos portadores de obesidade (n = 39). Quantificamos a expressão gênica por transcrição reversa e PCR quantitativa (RT-qPCR) de todos os genes do complexo *shelterin*, DKC1, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Nossos resultados demonstram um perfil de expressão gênica alterado quando comparada a expressão gênica das proteínas analisadas nos dois grupos estudados, controles e portadores de obesidade. Os indivíduos portadores de obesidade mostraram um perfil significativamente elevado dos genes TRF1, POT1, RAP1 e DKC1 ( $P < 0,05$ ). Não observamos correlação de expressão gênica entre os diferentes genes e o comprimento dos telômeros nos grupos estudados, mas sim com a DKC1 na obesidade. Entretanto, quando analisamos as associações entre os genes de complexo *shelterin* observamos mudanças significativas nas associações intra-grupo dependentes da condição de obesidade. Nossos resultados salientam a complexa e intrincada rede de fatores associados e desregulados durante o processo fisiopatológico da obesidade. Estudos adicionais serão necessários acrescentando novos fatores para tentar dissecar a regulação coordenada do comprimento dos telômeros na homeostase e no processo patológico da obesidade.

**Palavras chaves:** Complexo *Shelterin*, Inflamação, Obesidade, DKC1, TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, RAP1, Telômeros.

## ABSTRACT

In individuals with obesity, the excess of adipose tissue plays a key role in inducing a chronic and systemic inflammatory state. Like aging, obesity mimics cellular processes such as deterioration of tissues and organs and decreased ability to repair age-dependent DNA damages. In this context, the proinflammatory cytokines induce DNA damage that impact, especially in the most susceptible regions of the chromosomes, the telomeres. The telomeres, present at the ends of the chromosomes, are associated with a protein complex called the shelterin complex. The shelterin complex consists of 6 proteins (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 and RAP1), which together with accessory proteins such as dyskerin (DKC1), participate in telomere's length regulation and protect chromosomes from undesired erosion, enzymatic activities, non-homologous recombination and fusion of chromosomal terminations.

In recent years, positive relationships have been established between clinically different pathological conditions, such as those modulated by inflammation, and telomeres' length. Recently, our group demonstrated shortened telomeres in individuals with morbid obesity. Thus, the aim of the present study was to explore additional factors associated with telomeres' metabolism, such as gene expression of the shelterin complex components and proinflammatory cytokines, which may contribute to the accelerated shortening of the telomeres. We used peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples from healthy adults (n = 27) and adults with obesity (n = 39). We quantified gene expression by reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR) of all shelterin complex genes, DKC1, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Our results demonstrate an altered gene expression profile when compared to the gene expression of the proteins analyzed in the two studied groups, controls and individuals with obesity. Individuals with obesity showed a significantly elevated profile of TRF1, POT1, RAP1 and DKC1 (P < 0.05) genes. We did not observe correlation of gene expression between the different shelterin genes and the length of telomeres in the studied groups, but with DKC1 in obesity. However, when we analyzed the associations between the shelterin complex genes we observed significant changes in the intra-group associations dependent on the obesity condition. Our results highlight the complex and intricate network of associated and deregulated factors during the pathophysiological process of obesity. Further studies are needed together with the inclusion of additional factors to try to dissect the coordinated regulation of telomeres' length in homeostasis and in the pathological process of obesity.

**Key words:** *Shelterin complex*, inflammation, obesity, DKC1, TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, RAP1, telomeres.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo dos telômeros de humanos, complexo <i>shelterin</i> , e formação de loop T e D.....	9
Figura 2	Comprimento dos telômeros e sua dependência com o número de divisões celulares em células de origem germinativa, tronco pluripotentes, somáticas eucarióticas e transformadas.....	11
Figura 3	Estrutura dos telômeros humanos, complexo <i>shelterin</i> e interações com as subunidades da enzima telomerase.....	12
Figura 4	Esquema mostrando desenho de matriz de primers.....	26
Figura 5	Avaliação da expressão gênica relativa de TRF1 em indivíduos portadores de obesidade.....	32
Figura 6	Expressão gênica relativa similar de TRF2 em indivíduos obesos e controles eutróficos.....	33
Figura 7	Expressão gênica relativa similar de TPP1 entre indivíduos obesos e controles eutróficos.....	34
Figura 8	Avaliação da expressão gênica relativa da proteína POT1 em indivíduos obesos e controles eutróficos.....	35
Figura 9	Expressão gênica relativa aumentada de RAP1 em indivíduos portadores de obesidade.....	36
Figura 10	Expressão gênica relativa aumentada de DKC1 em indivíduos obesos e controles eutróficos.....	37
Figura 11	Expressão gênica relativa de IL-1 $\beta$ aumentada em indivíduos portadores de obesidade.....	38
Figura 12	Avaliação da expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$ em indivíduos obesos e controles eutróficos.....	39
Figura 13	Análise de correlação de Spearman entre as proteínas do complexo <i>shelterin</i> no grupo controle e no grupo obesos.....	40
Figura 14	Análise de correlação de Spearman entre as proteínas do complexo <i>shelterin</i> , DKC1 e razão T/S no grupo controle e no	

grupo obesos.....	42
Figura S1 Gráficos representativos das ampliações dos diferentes genes realizadas na qPCR utilizando o fluoróforo SYBRgreen como molécula de detecção.....	71
Figura S2 Figuras representativas das curvas de dissociação de temperatura (curvas de meltings) de cada gene amplificado.....	73
Figura S3 Confirmação dos produtos de PCR.....	75
Figura S4 Comparação da expressão gênica dos genes analisados no grupo controle (painel superior) e no grupo portadores de obesidade (painel inferior).....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de oligômeros e características dos experimentos.....	25
Tabela 2	Características demográficas.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização mundial da saúde
IMC	Índice de massa corporal
IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF 1	Fator estimulador de colônia de macrófagos 1
DDR	Respostas de danos ao DNA
DCV	Doenças cardiovasculares
SASP	Fenótipo secretor associado a senescência
CCL2	Do inglês “ <i>C-C Motif chemokine ligand 2</i> ”
b-FGF	Fator de crescimento fibroblastóide básico
HGF/SF	Do inglês “ <i>hepatocyte growth factor/scatter factor</i> ”
MMPs	Mieloperoxidasas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ER	Espécies reativas
hTERT	Do inglês “ <i>Human telomerase reverse transcriptase</i> ”
hTERC	Do inglês “ <i>Human telomerase RNA complement</i> ”
TRF1	Fator de repetição telomérico 1
TRF2	Fator de repetição telomérico 2
RAP1	Repressor/ativador da proteína 1
POT1	Proteína 1 de proteção dos telômeros
TPP1	Complexo TINT1/PIP1/PTOP1
TIN2	Proteína 2 de interação com TRF1
DKC1	Disquerina 1
T- LOOP	Laço em T
ATM	Do inglês “ <i>ataxia telangiectasia mutated</i> ”
ATR	Do inglês “ <i>ataxia telangiectasia and rad3-related protein</i> ”
PPARs	Do inglês “ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> ”
PGC1- $\alpha$	Do inglês “ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> ”
NF- $\kappa$ B	Do inglês “ <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ”
IKK	Do inglês “ <i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i> ”
IKB	Inibidor de Kappa B
cDNA	Do inglês “ <i>complementary DNA</i> ”
RNA	Do Inglês “ <i>ribonucleic acid</i> ”
gDNA	Do inglês “ <i>genomic DNA</i> ”
GNB2L1	Do inglês “ <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1</i> ”
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo II
DC	Disceratose congênita
PBMC	Do ingles “ <i>peripheral blood mononuclear cell</i> ”
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
iNOS	Do ingles “ <i>Inducible nitric oxide synthase</i> ”



Tel	Telomérico
MGUS	Do inglês “ <i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> ”
MM	Mieloma múltiplo
DCV	Doença cardiovascular

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é atualmente considerada um problema de saúde pública mundial com um gasto anual calculado em 147 bilhões de dólares no tratamento de comorbidades associadas à obesidade (Schmandt, Iglesias et al. 2011). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmam que cerca de 300 milhões de indivíduos no mundo possuem obesidade “clínica e/ou severa” ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) (Calyniuk, Grochowska-Niedworok et al. 2016) e estima que aproximadamente 2,8 milhões de mortes por ano estejam associadas à obesidade (Dalvand, Koohpayehzadeh et al. 2015).

Fatores como o estilo de vida inapropriado associados a hábitos dietéticos pouco saudáveis, diminuição da atividade física e o padrão de vida atribulado da população, parecem estar contribuindo com os crescentes dados apresentados na literatura sobre a fisiopatologia da obesidade e a sua maior incidência (Wu, Chou et al. 2014).

No Brasil, a percentagem de pessoas com sobrepeso aumentou de 43% em 2006 para 53% em 2014, enquanto a percentagem de pessoas com obesidade subiu de 11,9% para 17,9% no mesmo período (Gomez 2015).

O sobrepeso e a obesidade são definidos pelo índice de massa corporal ( $IMC = \text{peso (kg) dividido pela altura (m}^2\text{)}$ ). Indivíduos com escores entre 20,0 a 24,9  $\text{kg/m}^2$  são classificados como eutróficos, entre 25,0 a 29,9  $\text{kg/m}^2$  são classificados com sobrepeso e indivíduos com escores iguais ou superiores a 30,0  $\text{kg/m}^2$  são

definidos como indivíduos com obesidade, salvo algumas exceções (Tzanetakou IP 2012). Todavia, a obesidade severa ou grau II e muito severa ou grau III (mórbida), definidas pelo IMC  $\geq 35,0 \text{ kg/m}^2$  e  $\geq 40,0 \text{ kg/m}^2$ , respectivamente, são uma grave condição crônica de saúde, muitas vezes irreversível, que, como dito anteriormente, tem aumentado sua prevalência nas últimas décadas (Mattar 2008).

O sobrepeso e obesidade são condições que aumentam substancialmente o risco para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas como hipertensão (Calyniuk, Grochowska-Niedworok et al. 2016), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Malin and Kashyap 2016), dislipidemias (Bogl, Kaye et al. 2016), doenças coronarianas, infarto do miocárdio (Figuroa, Takx et al. 2016), osteoartrite (Perry and MacDonald 2016), apneia do sono, problemas respiratórios (Pleava, Gaita et al. 2016), câncer de mama (Bandera, Maskarinec et al. 2015), próstata e cólon (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia et al. 2013; Izano, Wei et al. 2016). Adicionalmente, o sobrepeso também aumenta o risco de morte por todas as causas investigadas (1998).

### *1.2 Obesidade associada a inflamação*

A inflamação aguda é um processo fisiológico complexo com síntese e secreção de mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas, e recrutamento de células do sistema imune com a finalidade de eliminar e limitar a invasão por um agente estranho (Cervantes-Villagrana, Cervantes-Villagrana et al. 2014).

Em indivíduos com sobrepeso ou com obesidade, o excesso de tecido adiposo é principalmente responsável pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, e ao contrário de resolver o insulto inflamatório agudo, sustenta um estado inflamatório crônico sistêmico (Rao, Zhong et al. 2014).

### *1.3 Secreção alterada de mediadores inflamatórios na obesidade*

A morte dos adipócitos no tecido adiposo por hipóxia induz a secreção de adipocinas como as interleucinas (IL) -1 $\beta$ , IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 (Wang, Wood et al. 2007). Essas adipocinas agem tanto em nível autócrino, parácrino como endócrino (sistêmico) e estimulam a ativação de células endoteliais. A alteração do fenótipo das células endoteliais inclui a expressão aumentada de moléculas de adesão. Essas modificações são responsáveis pelo recrutamento de monócitos da corrente sanguínea, os quais, guiados por um gradiente quimiotático, migram para o tecido adiposo no sítio de inflamação (Rausch, Weisberg et al. 2008; Oh, Morinaga et al. 2012).

Induzidos pelo ambiente pró-inflamatório no contexto da obesidade, os monócitos diferenciam-se em macrófagos associados a um perfil de expressão com predominância de secreção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Oh, Morinaga et al. 2012). Os adipócitos também produzem e secretam o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF ou CSF-1) o qual é um regulador primário da sobrevivência e diferenciação de macrófagos (Weisberg, McCann et al. 2003).

A morte celular dos adipócitos por necrose em determinados locais do tecido adiposo em hipóxia induz um ciclo vicioso de diferenciação de células precursoras em macrófagos, infiltração de monócitos do sangue periférico e diferenciação em macrófagos, com perfil pró-inflamatório. Esse ciclo patológico induzido por estresse inflamatório crônico perpetua um fenótipo de inflamação, desregula a homeostase celular do tecido e modula o fenótipo de secreção das células. Essa modulação do

fenótipo compromete o destino final das células e promove o estado de senescência celular (Cinti, Mitchell et al. 2005) (Shu, Benoist et al. 2012).

#### *1.4 Senescência celular associada ao envelhecimento*

A senescência celular em células proliferativas é definida *in vitro* como um estado de parada irreversível do ciclo celular em células metabolicamente ativas. Este fenômeno foi descrito inicialmente *in vitro* em cultura de fibroblastos humanos. Nesse sentido, Hayflick e Moorhead demonstraram que as células normais têm uma capacidade limitada de proliferar (Hayflick and Moorhead 1961).

Sabe-se hoje que a habilidade das células somáticas em se dividir declina a cada divisão celular e, do ponto de vista fisiológico, está associada ao encurtamento progressivo das porções terminais dos cromossomos, denominadas de telômeros (Bodnar, Ouellette et al. 1998). Nesse sentido, quando os telômeros atingem um tamanho mínimo crítico, a célula sinaliza e dispara sinais de parada de ciclo celular, caracterizando o estado de senescência replicativa (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick 1965; Harley, Futcher et al. 1990; Allsopp 1996; Bodnar, Ouellette et al. 1998).

As condições associadas a senescência replicativa podem ser determinadas por eventos internos ou externos, como a resposta a estresse celular em casos de radiação ionizante, estresse oxidativo, ambiente pró-inflamatório e a indução de oncogenes (Serrano 1997).

O impacto da senescência celular sobre o organismo tem mostrado modificar o estado de saúde geral dos indivíduos para piores prognósticos ao longo da vida. De fato, as células senescentes induzem um microambiente nocivo para

os tecidos caracterizado por disfunção celular (Eren, Boe et al. 2014) e redução da capacidade regenerativa dos tecidos (Krishnamurthy, Ramsey et al. 2006; Wu, Chen et al. 2007; Barker, Bartfeld et al. 2010).

A frequência aumentada de células senescentes tem sido associada ao desenvolvimento precoce de doenças presentes somente em idades mais avançadas, como diabetes (Sone and Kagawa 2005), aterosclerose (Minamino and Komuro 2007), ou inflamação (Franceschi, Capri et al. 2007). Somado a isso, a eliminação de células senescentes tem mostrado atenuar os sintomas associados com a idade (Baker, Wijshake et al. 2011). Neste sentido, os dados acima expostos sugerem que as células senescentes podem ter um papel causal na disfunção de órgãos, tecidos e do organismo como um todo.

### *1.5 Envelhecimento associado a inflamação: inflammaging*

O envelhecimento do indivíduo é caracterizado por vários fatores (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013). Dentre eles foi observado um estado inflamatório sistêmico crônico, hoje denominado “*inflammaging* (Franceschi, Capri et al. 2007)”. O termo “*inflammaging*” foi cunhado por Franceschi e colaboradores em 2007 e define um desbalanço entre processos inflamatórios e antiinflamatórios associados com o avanço da idade (Franceschi, Capri et al. 2007). Todavia, o perfil de inflamação de baixo grau persistente denominado “parainflamação”, também está presente em indivíduos com obesidade. Os efeitos adversos da inflamação como secreção de citocinas inflamatórias, diminuição dos mecanismos de reparo do DNA (DDR resposta de danos ao DNA), encurtamento de telômeros (Rode, Nordestgaard et al. 2014) e diminuição de defesas antioxidantes (Razavi, Baghshani et al. 2013; Karaman, Aydin et al. 2015; Lubrano, Valacchi et al. 2015)

parecem estar potencializados em indivíduos com obesidade e sua presença aumenta o risco para o surgimento precoce de doenças associadas a idade (DCV, DMT2, doenças autoimunes e câncer) (Ouchi 2011). Isso sugere que tanto o envelhecimento como a obesidade são processos ou estados interconectados que compartilham características comuns.

#### 1.6 Fenótipo secretor associado a senescência (SASP)

Em nível celular a característica mais importante do fenômeno da senescência ou envelhecimento celular é seu fenótipo secretor comumente denominado SASP (do inglês *senescence-associated secretory phenotype*). O fenótipo senescente ou SASP é caracterizado pelo aumento da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e CCL2, fatores de crescimento como bFGF (do inglês *basic fibroblast growth factor*) e HGF/SF (do inglês *hepatocyte growth factor/scatter factor*), proteases tais como as mieloperoxidases (MMPs) e espécies reativas de oxigênio (Derosa, Sahebkar et al.) (Coppe, Patil et al. 2008; Ohanna, Giuliano et al. 2011; Malaquin, Vercamer et al. 2013). As quais podem agir de forma autócrina, parácrina ou endócrina (Costa, Walker et al. 2013).

Dois trabalhos demonstraram a contribuição causal da inflamação crônica sistêmica de baixo grau, como indutor de senescência celular e disfunção telomérica levando os indivíduos para um fenótipo de envelhecimento precoce (Brandacher, Hoeller et al. 2007; Newsholme and de Bittencourt 2014). Aqui, a frequência aumentada de células senescentes, característica de envelhecimento precoce, ainda foi associada ao desbalanço redox contido nos indivíduos com obesidade (Brandacher, Hoeller et al. 2007; Newsholme and de Bittencourt 2014).

A presença de estresse oxidativo demonstrou estimular o desenvolvimento de SASP nos tecidos, contribuindo substancialmente para o surgimento prematuro de comorbidades associadas à obesidade, especialmente nos casos de obesidade severa grau II ou superior (Brandacher, Hoeller et al. 2007; Newsholme and de Bittencourt 2014).

Assim, a senescência celular também contribui com a inflamação através do SASP. Novamente, a senescência celular alimenta a um ciclo vicioso de inflamação crônica que pode aumentar eventos associados ao encurtamento ou erosão telomérica e conseqüentemente, ao acúmulo de células senescentes (Yeh and Wang 2016).

### *1.7 Estilo de vida e comprimento de telômeros*

Diferentes condições de saúde como doenças cardiovasculares (Haycock, Heydon et al. 2014), fumo (Alder, Guo et al. 2011), e severidade da asma (Kyoh, Venkatesan et al. 2013) tem uma influência negativa no comprimento dos telômeros e aceleram a taxa de encurtamento fisiológico. Assim, o comprimento dos telômeros tem sido usado como relógio biológico de senescência celular e envelhecimento biológico capaz de prever a capacidade replicativa das células (Chen, Yeh et al. 2014).

Nesse sentido, o comprimento dos telômeros ou seu encurtamento precoce está sendo avaliado como um importante biomarcador biológico. Mais ainda, a literatura sugere que os mecanismos envolvidos no processo de aceleração do encurtamento de telômeros talvez possam ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para promover saúde e direcionar o diagnóstico preventivo da população para várias doenças associadas ao envelhecimento (Stoker).



Já está bem estabelecido que os indivíduos com obesidade apresentam um elevado perfil de citocinas pró-inflamatórias (Falkner, DeLoach et al. 2013) e elevada concentração de espécies reativas (ER) (Razavi, Baghshani et al. 2013), as quais também aumentam a taxa de atrito telomérico (Jones, Prior et al. 2014). Assim, a inflamação crônica somada ou separadamente ao estresse oxidativo, resultam no desgaste acelerado dos telômeros, tanto no tecido vascular como em nível sistêmico (De Meyer, Rietzschel et al. 2011).

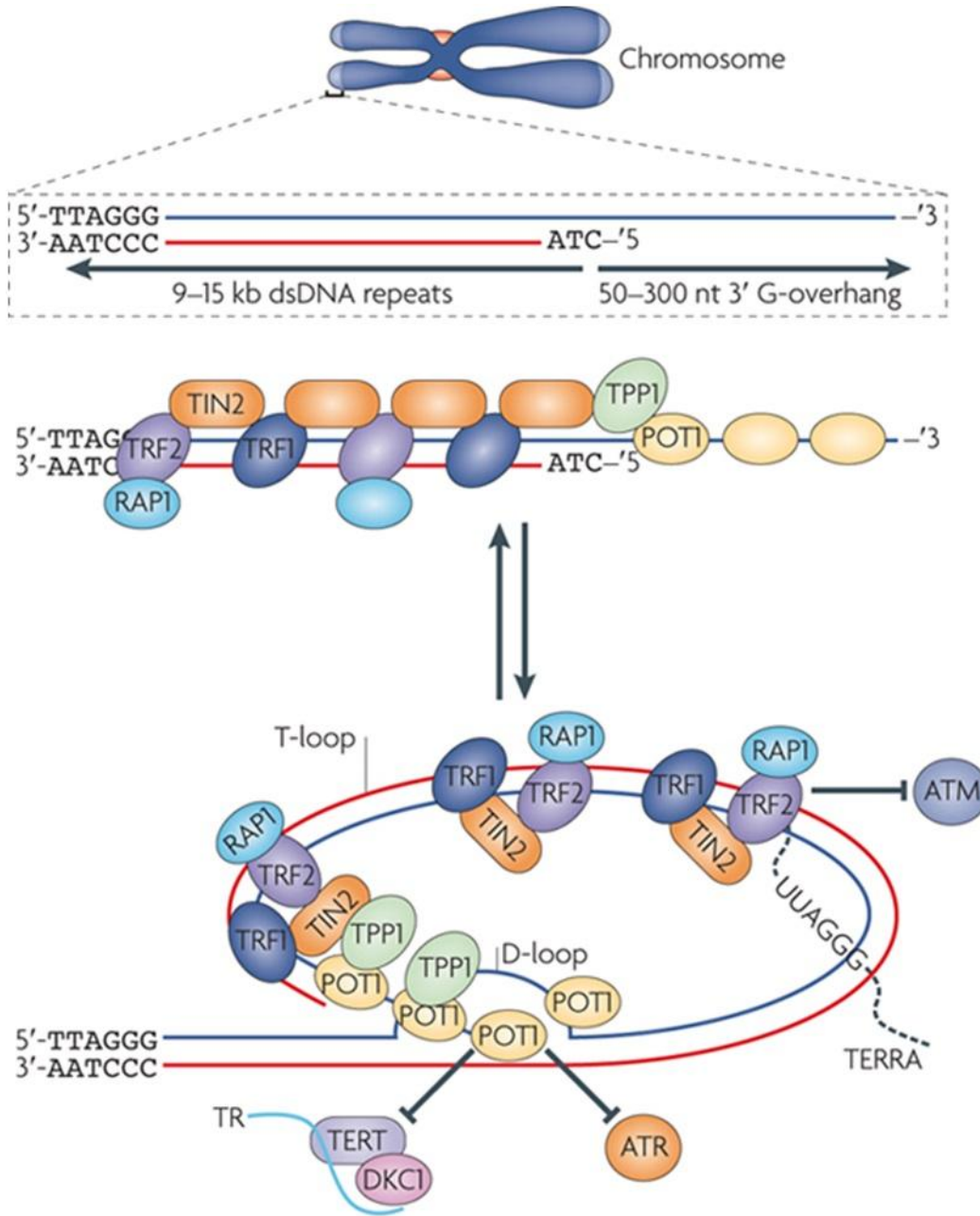
Uma revisão sistemática com metanálise recentemente publicada pelo nosso grupo sugere que a obesidade é um dos fatores que induz aceleração da taxa de atrito telomérico (Mundstock, Zatti et al. 2015). Entretanto, embora exista uma tendência inversa a favor do encurtamento prematuro dos telômeros em leucócitos do sangue periférico de indivíduos obesos, as evidências presentes na literatura não permitiram estabelecer uma relação causal entre obesidade e encurtamento telomérico devido a grande heterogeneidade dos estudos (Mundstock, Zatti et al. 2015).

Na mesma linha de investigação, nosso grupo demonstrou que indivíduos com obesidade mórbida apresentaram telômeros mais curtos, quando comparados com indivíduos eutróficos controles (mediana (intervalo de confiança IC95%); 0,43 (0,39-0,63) versus 1,06 (0,88-2,29);  $P = 0,026$ ) associados a uma correlação inversa significativa entre o comprimento dos telômeros com o IMC ( $r = -0,4174$ ;  $P = 0,0005$ ) (Grun & Barbé-Tuana, manuscrito em preparação).

### 1.8 Telômeros

Os telômeros (do grego *telos*, final, e *meros*, parte) são estruturas nucleoprotéicas altamente especializadas presentes nas extremidades dos cromossomos lineares de eucariotos (Koliada, Krasnenkov et al. 2015). Em

mamíferos, eles são formados por repetições de hexâmeros dos nucleotídeos 5' TTAGGG 3', com uma protrusão de fita simples 3' (Figura 1) (O'Sullivan and Karlseder 2010).



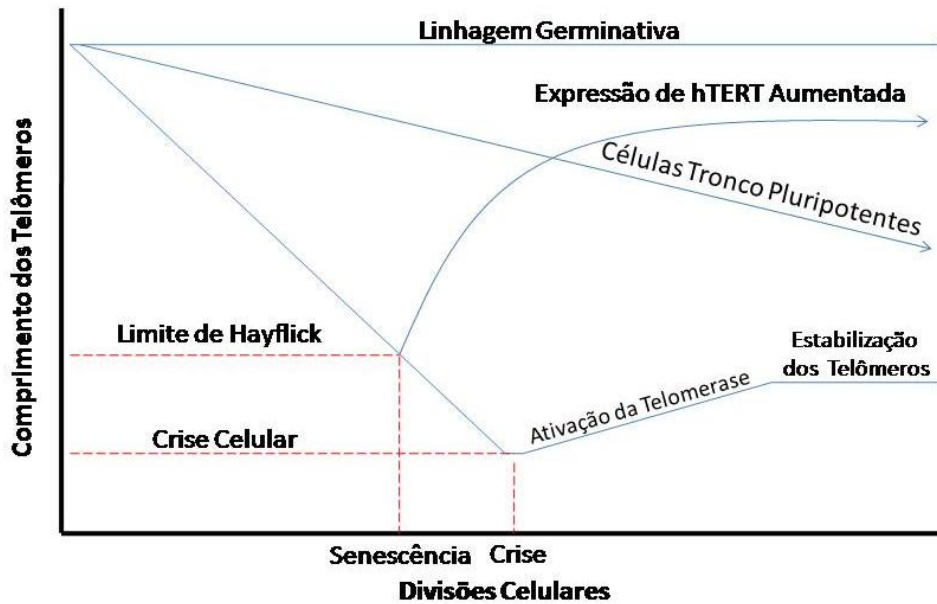
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 1. Esquema ilustrativo dos telômeros de humanos, complexo *shelterin*, e formação de loop T e D.** Adaptado de Roderick J. O'Sullivan & Jan Karlseder, 2010.

Os telômeros têm a função de proteger a informação contida no genoma. Assim, as sequências repetitivas dos telômeros, associadas a um complexo proteico evitam a ação de nucleases, previnem a fusão cromossômica, evitam o rearranjo de quebras de fita de DNA e eventos inespecíficos de fusão cromossômica (Armanios and Blackburn 2012; Rubtsova, Vasilkova et al. 2012).

A enzima responsável pela síntese dos telômeros durante a replicação do DNA é denominada de Telomerase (Greider 2010). A telomerase é uma enzima com atividade de transcriptase reversa, ou seja, sintetiza a porção telomérica final dos cromossomos de DNA, utilizando como molde para a síntese, uma sequência molde de RNA (Rubtsova, Vasilkova et al. 2012). A telomerase é composta por duas subunidades. A subunidade com a atividade catalítica TERC e a subunidade que contempla o molde de RNA TERT (EC:2.7.7.49) (Greider 2010).

Entretanto, a enzima telomerase somente encontra-se ativa em células de origem hematopoiética, tumorais e células da linhagem germinativa. Nas células somáticas a enzima telomerase é inativada no momento do nascimento (Zhou, Zhou et al. 2014) e o encurtamento dos telômeros torna-se um processo fisiológico nas células somáticas, que ocorre de forma natural a cada divisão celular (Figura 2) (Zhang, Rane et al. 2016).



**Figura 2. Comprimento dos telômeros e sua dependência com o número de divisões celulares em células de origem germinativa, tronco pluripotentes, somáticas eucarióticas e transformadas.** Adaptado de Cong, Yu-sheng; Wright, Woodring e.; Shay, Jerry W 2002.

### 1.9 Complexo shelterin

A estrutura tridimensional dos telômeros demonstra uma protrusão de DNA fita simples associada a um conjunto de proteínas, denominadas de complexo *shelterin*. As proteínas do complexo *shelterin* têm a função de proteger fisicamente os telômeros contra respostas de dano ao DNA. Pela proximidade física, o complexo *shelterin* também regula a atividade da enzima telomerase sobre os telômeros (Turner, Vasu et al. 2014).

O complexo *shelterin* é formado por seis proteínas denominadas, TRF1 e TRF2 (fator de repetição telomérico 1 e 2 respectivamente), RAP1 (repressor/ativador da proteína 1), TIN2 (proteína 2 de interação com TRF1), TPP1 (complexo TINT1/PIP1/PTOP1) e POT1 (proteína 1 de proteção dos telômeros) (Figura 3) Adaptado de Armanios & Blackburn, 2012.



Um trabalho publicado recentemente indica que TRF1 e TRF2 são proteínas que atuam como homodímeros sobre o DNA telomérico de fita dupla através de seus domínios terminais homólogos MYB. Assim a proteína RAP1 é recrutada até os telômeros através de sua interação específica com TRF2. POT1 liga-se ao DNA telomérico de fita simples e forma um heterodímero com TPP1. Enquanto isso, TIN2 forma uma ponte entre as os dois homodímeros TRF1 e TRF2 e o heterodímero TPP1/POT1 estabilizando todo o complexo (Figura 3) (Bandaria, Qin et al. 2016).

A proteína TRF1 tem sido citada como componente principal em telômeros humanos pois parece ser a proteína chave para a atração e formação das outras proteínas do complexo *shelterin* (Garcia-Beccaria, Martinez et al. 2015). Se comporta como um regulador negativo da atividade da telomerase e tem se mostrado um alvo potencial para o tratamento do câncer (Zimmermann, Kibe et al. 2014)

A deleção de TRF1 em células de mamíferos é acompanhada pelo surgimento de danos ao DNA telomérico de fita dupla presentes em todo o DNA (Martinez, Thanasoula et al. 2009). Da mesma forma, a deleção de TRF1 está associada a uma maior ativação da via de sinalização de reparo ao DNA ATM/ATR (do inglês *Ataxia Telangiectasia Mutated* e *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein*) e seus alvos posteriores (Martinez, Thanasoula et al. 2009). Todavia, a deleção de TRF1 leva a alterações nos cromossomos como, fusão de telômeros de cromossomos irmãos e fusão extremidade-extremidade dos cromossomos (Martinez, Thanasoula et al. 2009).

A deleção de TRF2 também leva a ativação da via de ATM/ATR e indução de focos de dano ao DNA telomérico, os quais também resultam em fusão

extremidade-extremidade teloméricas por recombinação não homologa. Dessa forma muitas vezes as células entram em senescência ou disparam cascatas de sinalização que eventualmente culminam em eventos de apoptose (Choi, Farrell et al. 2011; Konishi, Izumi et al. 2016). TRF2 parece ser uma das principais proteínas do complexo *shelterin* a impedir que os telômeros sejam reconhecidos como quebras de DNA de fita dupla (Choi, Farrell et al. 2011).

A terceira proteína que compõe o complexo *shelterin* é a proteína TIN2. TIN2 mostra-se essencial para manter o complexo *shelterin* interligado sobre a porção telomérica. Além disso, a depleção de TIN2, a qual está fortemente associada a TPP1, mostra reduzir os níveis de telomerase associada aos telômeros dependente de TPP1. Assim, TIN2 possui um efeito indireto no recrutamento da telomerase nos telômeros, pois ancora a proteína TPP1 na região telomérica (Walne, Vulliamy et al. 2008). Mutações no gene de TIN2 têm sido associadas a patologias teloméricas como a doença Disceratose Congênita (DC) (Walne, Vulliamy et al. 2008).

Experimentos *in vitro* mostram que a superexpressão de TIN2 inibe a atividade da telomerase mesmo em células que expressam a telomerase (Chiang, Kim et al. 2004). Todavia, a coesão das proteínas do complexo *shelterin* ocasionada por TIN2 favorece a proteção dos telômeros contra ativação da via de resposta de dano ao DNA ATM/ATR. A importância de TIN2 tem sido mostrada em experimentos onde a deleção de TIN2 leva a letalidade embrionária independentemente de ativação da telomerase (Chiang, Kim et al. 2004).

Em mamíferos, POT1a (do inglês *protection of telomeres protein 1*) associa-se com RPA (do inglês *replication protein A*) prevenindo a sinalização da via ATR e

POT1b é requerida para formação tridimensional da estrutura telomérica (Frescas and de Lange 2014). Em humanos, a proteína POT1 possui um domínio único de ligação ao DNA de fita simples localizado na sua porção N-terminal, o qual permite que a proteína POT1 se ligue a sequência telomérica TTAGGG com elevada especificidade (Baumann and Cech 2001; Loayza, Parsons et al. 2004). POT1 parece ser um regulador negativo da atividade da enzima telomerase, a qual potencialmente inibe sua alocação sobre os telômeros e evita a interação com outras proteínas (Takai, Jenkinson et al. 2016).

Ainda, estudos apontam que POT1 forma um heterodímero com TPP1. Entretanto, TPP1 possui na sua porção N-terminal um domínio OB (do inglês *oligonucleotide/oligosaccharide-binding*) chamado de porção TEL que se mostra importante para a ativação da telomerase, principalmente por prover uma interface de recrutamento para telomerase para os telômeros e ainda melhorar sua processividade (Abreu, Aritonovska et al. 2010; Nandakumar, Bell et al. 2012; Zhong, Batista et al. 2012; Frescas and de Lange 2014; Dalby, Hofr et al. 2015).

TPP1 também tem sido citada com uma proteína que forma uma ponte entre o DNA de fita simples e DNA de fita dupla telomérico, além de ajustar POT1 sobre os telômeros provavelmente pela formação do heterodímero TPP1/POT1 o qual prove maior estabilidade a POT1 sobre o DNA telomérico (Rajavel, Orban et al. 2016).

A proteína TPP1 é um componente chave para a manutenção da organizada conformação do complexo *shelterin*, estabilizando TRF1, TRF2, TIN2 e POT1 sobre os telômeros (Qiang, Wu et al. 2014).



Por fim, acredita-se que RAP1 seja responsável por atrair TRF2 para os telômeros. RAP1 parece ser dispensável para o capeamento dos telômeros. Entretanto, na sua ausência há um aumento do número de recombinações teloméricas com consequente piora da fragilidade dos telômeros, tornando-a importante para estabilidade genômica (Martinez, Thanasoula et al. 2010). Assim sendo, RAP1 é essencial para reprimir os mecanismos de reparação homóloga e não homóloga do DNA (HDR e NEJH, do inglês *homology-directed repair* e *non-homologous end-joining*) indesejáveis nas regiões teloméricas (Sfeir, Kabir et al. 2010).

Além de RAP1 interagir com TRF2, a proteína RAP1 também possui sítios de ligação independentes da região telomérica e subtelomérica. Esse achado sugere um importante papel na regulação da expressão de genes adicionais, principalmente os envolvidos no metabolismo energético (Martinez, Gomez-Lopez et al. 2016). Dessa forma, essa proteína poderia ser considerada um fator importante como mediador entre a biologia dos telômeros e o metabolismo geral celular.

Contudo, a expressão alterada de proteínas do complexo *shelterin* tem impacto significativo na capacidade proliferativa das células. A disfunção telomérica, induzida por perda da estabilidade do complexo *shelterin*, denominada descapeamento dos telômeros (do inglês, *telomeres uncapping*) induz a ativação de DDR, a qual pode culminar em indução de senescência ou apoptose das células comprometidas (Hockemeyer, Palm et al. 2008; Palm and de Lange 2008).

Mutações ou inativações de diferentes componentes do complexo *shelterin* e inclusive presentes na proteína acessória disquerina (DKC1) já foram descritos e

tem sido associadas a importantes doenças crônicas severas como anemia aplástica e DC (Walne, Vulliamy et al. 2008; Savage and Alter 2009; Savage, Dokal et al. 2009). Modelos em animais experimentais salientam a importância das proteínas do complexo *shelterin* na rápida indução de declínio da capacidade regenerativa de tecidos e envelhecimento acelerado, mesmo na presença de telômeros com comprimento normal (Martinez, Thanasoula et al. 2010). Entretanto, não há estudos que descrevam o perfil de expressão gênica do complexo *shelterin* e proteínas acessórias em indivíduos portadores de obesidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da obesidade possui íntima relação com o surgimento de várias doenças, as chamadas comorbidades, presentes em indivíduos idosos. Os indivíduos portadores de obesidade apresentam um perfil oxidativo e inflamatório crônico sistêmico aumentado. Por fim, os indivíduos portadores de obesidade apresentam um declínio das funções celulares e vulnerabilidade aumentada associada a um fenótipo de senescência celular precoce evidenciado por telômeros mais curtos.

Entretanto, até o momento não há estudos na literatura que relacionem o encurtamento dos telômeros com a expressão gênica de fatores regulatórios da homeostase telomérica, como as proteínas do complexo *shelterin*, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) no contexto da obesidade.

Por tal motivo, esse trabalho visa descrever a expressão gênica dos componentes do complexo *shelterin* e sua associação com citocinas inflamatórias e comprimento de telômeros. A hipótese desse nosso trabalho é que indivíduos portadores de obesidade com telômeros encurtados apresentam um perfil gênico do complexo *shelterin* desregulado acompanhado por um perfil pró-inflamatório aumentado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivos Gerais*

Determinar se existe uma associação entre o encurtamento dos telômeros e o perfil molecular de genes do complexo *shelterin* e citocinas pró- inflamatórias, em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade (IMC  $\geq$  35,0 kg/m<sup>2</sup>) quando comparados com indivíduos sadios não obesos.

#### 3.2 *Objetivos Específicos*

a) Determinar o perfil de expressão gênica de componentes do complexo *shelterin*;

b) Determinar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias;

c) Determinar se existe uma associação entre o perfil de expressão gênica do complexo *shelterin*, DKC1, citocinas pró-inflamatórias e o encurtamento telomérico, nos indivíduos portadores de obesidade mórbida, quando comparados aos seus controles.

## PARTE II

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 *Delineamento do estudo*

Estudo transversal.

### 4.2 *População do estudo*

O projeto atual utilizou sangue periférico de indivíduos previamente recrutados para o projeto “*Determinação do comprimento de telômeros em diferentes populações celulares de obesos mórbidos*”, em andamento desde 2014, previamente aprovado pelo CEP da UFRGS e da PUCRS, sob os protocolos 760.537 e 640.817, respectivamente (Anexos 1 e 2).

#### 4.2.1 *Voluntários alocados ao grupo casos*

Os indivíduos desse estudo são pacientes com obesidade (IMC  $\geq 35,0$  kg/m<sup>2</sup>), que recentemente se juntaram ao Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Foram incluídos nesse estudo adultos com idades entre 18 a 65 anos. Os participantes foram avaliados pelos médicos colaboradores deste projeto (Dr. Cláudio C. Mottin e Dr. Alexandre V. Padoin).

#### 4.2.2 *Voluntários alocados ao grupo controles*

Indivíduos adultos (idades entre 18 a 65 anos) eutróficos (IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>), sem comorbidades, não fumantes nem consumidores de álcool ou outras drogas, que concordaram em participar do projeto.

### 4.3 *Cálculo amostral*

O estudo foi baseado em uma variável de resposta contínua (IMC), com grupo controle e de casos, independentes. Para a realização desse estudo, o número mínimo recrutado foi de 54 indivíduos, 27 indivíduos do grupo caso pareados com o grupo controle (27 indivíduos). O tamanho amostral foi suficiente para elucidar uma relação entre tamanho de telômeros, obesidade, e sua associação com o nível de expressão dos genes do complexo *shelterin*, bem como sua relação com níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias assumindo um poder estatístico de 80% e um nível de significância de 5%.

### 4.4 *Coleta de material biológico*

De cada indivíduo participante foram coletadas duas amostras de 5 mL de sangue venoso periférico (total 10 mL), em tubo suplementado com anticoagulante (EDTA, Emogard). O sangue recebido foi centrifugado, o plasma foi separado e o sangue periférico foi reconstituído com o mesmo volume de solução salina tamponada (D-PBS, *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos). Posteriormente as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram separadas em gradiente de densidade (Histopaque 1,077 g/mL, Sigma, Missouri, EUA). Finalmente, alíquotas de PBMC foram separadas para purificação de DNA genômico (gDNA) ou foi adicionado 750 µl de TRIzol (Invitrogen) para posterior extração de RNA total. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C até a realização dos experimentos.

### 4.5 *Técnicas de biologia molecular*

#### 4.5.1 *Extração de RNA total*

O RNA total foi extraído com TRIzol (Invitrogen). Quando no momento da extração, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 200 µl de clorofórmio (Nuclear, Brasil) às amostras e as misturadas vigorosamente por 15 segundos. Seguidamente as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, e centrifugadas a 12.000xg a 4°C, por 15 minutos. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para novo tubo de microcentrífuga e foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico (Nuclear) para cada 750 µl de TRIzol. Em seguida as amostras foram suavemente misturadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Depois da incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 1 mL de etanol (75% v/v) diluído em H<sub>2</sub>O tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma). Por fim, as amostras foram centrifugadas a 7.500xg por 5 minutos a 4°C, em finalmente foi descartado o sobrenadante. O precipitado foi seco por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente o RNA foi ressuscitado em 13 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC e estocado a -80 °C até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA).

#### 4.5.2 Síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT- qPCR)

Prévia a síntese de cDNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 260nm.

A síntese do cDNA foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Maryland, EUA). Resumidamente, foram adicionados 2,0 µl de 10XRT Buffer, 0,8 µl de dNTP Mix (100 mM), 2,0 µl de 10XRT *Random Primers*, 1,0 µl de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1,0 µl de



inibidor de RNase, e 3,2 µl de H<sub>2</sub>O. Em seguida, a reação foi completada com 10 µl de RNA total (30 ng/µl) de cada respectiva amostra.

Foi utilizado o termociclador Verity (Applied Biosystems) seguindo as especificações de corrida sugeridas pelo fabricante: uma primeira incubação das amostras por 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C, e uma última incubação a 85°C por 5 minutos. Para as reações de PCR o cDNA total foi diluído 1:20 em água de injeção.

#### 4.5.3 *Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)*

Foi verificada a nomenclatura correta de cada gene-alvo escolhido no *Hugo Gene Nomenclature Committee* (HGNC) (<http://www.genenames.org/>) e sua sequência em bancos de dados disponíveis com livre acesso (<http://www.ensembl.org/index.html>).

O desenho dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi realizado como o programa Primer3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os oligonucleotídeos iniciadores escolhidos para realizar os experimentos de expressão gênica estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1. Lista de *primers* utilizados e condições dos experimentos.**

Gene Alvo	Nome	Sequência de <i>primers</i>	Pb	TA	Primer direto	Primer reverso
NM_017489.2 NM_003218.3	TRF1	5'GCCCTGATGATTTGGGGTTC 3' 5'TGCCATTTTCCATACAAACAGC	106 pb	58°	62,5 nM	125,0 nM
NM_005652.4	TERF2	5'GTGTCTGTGTCGGGATTGAAG3' 5'GGATTTCGACCACTGCTTCTG3'	142 pb	59°	62,5 nM	31,25 nM
NM_018975.3	RAP1	5'ATGATCCACCCACACCTGAG3' 5'GGAAGGCCTGTGTAAGTGTG3'	165 pb	60°	100 nM	100 nM
NM_000391.3	TPP1	5'TGTTCCACGGCCTTCATAC3' 5'CTGACCACCCAGTAGCCATC3'	155 pb	59,5°	62,5 nM	15,62 nM
NM_001042594.1 NM_015450.2	POT1	5'CGGAGAACAAGCGACTATGC3' 5'TAGGAAGAGTTTAGCGGGGC3'	102 pb	59°	62,5 nM	125 nM
NM_001288747.1 NM_001363.4 NM_001142463.2	DKC1	5'CTGCTATGGGGCCAAGATTA3' 5'GCAGATTGCTTCTCCTTTGG3'	106 pb	57°	75 nM	75 nM
NM_000576.2	IL1 $\beta$	5'TGGCCCTAAACAGATGAAGTG3' 5'GAAGGTGCTCAGGTCATTCTC3'	199pb	57°	100 nM	100 nM
NM_000594.3	TNF- $\alpha$	5'TCTCTCTAATCAGCCCTCTGG3' 5'GCTTGAGGGTTTGCTACAAC3'	94pb	60°	100 nM	100 nM
NM_006098	GNB2L1 <sup>a</sup>	5'GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG3' 5'GCTTGAGGTTAGCCAGGTTTC3'	224pb	60°	100 nM	100 Nm

Abreviaturas: IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; TRF1: Fator de repetição telomérico 1; TRF2: Fator de repetição telomérico 2; RAP1: Repressor/ativador da proteína 1; POT1: Proteína 1 de proteção dos telômeros; TPP1: Complexo TINT1/PIP1/PTOP1; DKC1: Disquerina 1; GNB2L1: *Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1*; TA: Temperatura de anelamento; Pb: pares de bases. <sup>a</sup>Gene constitutivo (Ishii, Wallace et al. 2006).

#### 4.5.4 Matriz de oligonucleotídeos iniciadores

Ainda, para padronizar as concentrações a serem usadas de cada par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhada uma matriz para cada *primer*. Assim foi escolhida a concentração de oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso ótima.

Sucintamente, para a realização da matriz de oligômeros, foi feita uma diluição seriada de ambos os *primers*, direto e reverso, desde 250 nM respectivamente até 15,6 nM. Para cada reação da matriz original, ou seja, cada combinação de concentração de *primers* direto e reverso, foi incluído um controle negativo onde foi substituído o mesmo volume de DNA molde a ser amplificado por H<sub>2</sub>O.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12
	R----->										
<b>F</b>											
<b>A</b>	F250 R250	F250 R125	F250 R62,5	F250 R31,2	F250 R15,6		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>B</b>	F125 R250	F125 R125	F125 R62,5	F125 R31,2	F125 R15,6		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>C</b>	F62,5 R250	F62,5 R125	F62,5 R62,5 R62,5	F62,5 R31,2	F62,5 R15,6		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>D</b>	F31,2 R250	F31,2 R125	F31,2 R62,5	F31,2 R31,2	F31,2 R15,6		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>E</b>	F15,6 R250	F15,6 R125	F15,6 R62,5	F15,6 R31,2	F15,6 R15,6		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Figura 4. Esquema mostrando desenho de matriz de primers.** Placa de 96 poços mostrando diluição seriada dos oligonucleotídeos iniciadores direto (F) e reverso (R). As setas contínuas e pontilhadas, respectivamente, indicam o sentido da diluição seriada dos oligômeros direto (do inglês *forward*) e reverso (do inglês *reverse*). Nos poços A1a E5 foi incluído o DNA molde a ser amplificado. Nos poços A7 a E12 foi adicionado H<sub>2</sub>O (controles negativos).

Todavia, para a escolha da concentração mais adequada, foi analisado o pico de intensidade de fluorescência obtido pela curva de dissociação (curva de *melting*).

#### 4.5.5. Expressão gênica

O cDNA sintetizado foi utilizado como molde nas reações de qPCR para a detecção da expressão gênica do complexo *shelterin* TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 e RAP1, além de, DKC1. GNB2L1 foi utilizado como gene constitutivo. O gene constitutivo foi escolhido pelo programa geNorm v3.0, o qual calcula entre todos os genes analisados os que menos variam no experimento para serem utilizados como genes de referência.

O estado inflamatório dos participantes foi avaliado pela quantificação da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Todas as reações consistiram em um volume final de 20  $\mu$ L contendo 2 $\mu$ L de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,0 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 0,2  $\mu$ L de dNTP (10 mM, Ludwig Biotec, RS, Brasil), 2  $\mu$ L de SYBR® Green I 1X (Sigma-Aldrich) e 0,05  $\mu$ L de Taq Polimerase (5U/ $\mu$ L, Invitrogen). As concentrações dos oligômeros escolhidas estão descritas na Tabela 1.

Todas as corridas foram realizadas no aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems) com o programa StepOne™ versão 2.2.2 (Applied Biosystems). As corridas foram realizadas em 3 etapas a diferentes temperaturas. Na primeira, as amostras foram incubadas por 2 min a 50°C, seguidas de 2 minutos a 95°C, e finalmente foram realizados 40 ciclos da seguinte maneira: 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Como etapa final para a confirmação do produto específico único incluímos na corrida a análise da curva de dissociação (curva de *melting*).

#### 4.6 Análise e documentação em géis de agarose

Foi confirmado o tamanho dos fragmentos esperados por corrida eletroforética em gel de agarose ao 3%. Os produtos da PCR foram evidenciados pela coloração com SYBRsafe (Invitrogen) e documentados após digitalização (*Geliance 600 Imaging System, PerkinElmer, Connecticut, EUA*) após iluminação com luz ultravioleta.

#### 4.7 Análise comparativa da expressão relativa pelo método $\Delta\Delta CT$

A análise foi realizada pelo método comparativo  $\Delta\Delta CT$  (Livak and Schmittgen 2001). Na fase inicial da análise, foi excluída toda triplicata com diferença  $\geq 0,5$  ciclos, as quais foram repetidas em outra placa (média das três triplicatas). A diferença entre a média das triplicatas (gene alvo – gene de referência) foi calculada gerando o  $\Delta CT$ . Posteriormente, foi subtraído o valor de  $\Delta CT$  de cada amostra do valor médio ( $\Delta CT_m$ ) de todas as amostras gerando o valor de  $\Delta\Delta CT$ . Por fim foi calculada a expressão média do gene de cada amostra pelo cálculo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Ainda, para confirmar a variabilidade inter-placa entre as diferentes corridas do mesmo gene, foi incluída em cada placa uma amostra de referência (escolhida aleatoriamente) cuja variação também foi menor de 0,5 ciclos entre as diferentes placas. As placas dos mesmos genes foram analisadas com o mesmo nível de detecção de fluorescência (*threshold*) para todas as corridas.

#### 4.8 Testes estatísticos

O teste de Kolmogorov–Smirnov foi realizado a fim de verificar se havia normalidade na distribuição das amostras para cada variável. Utilizamos teste T de *Student* ou teste U de Mann-Whitney, para a comparação entre os dois grupos,

dependendo da distribuição dos dados. Para a comparação entre três ou mais grupos, foi utilizada a análise de variância ANOVA para os dados que seguiram a distribuição normal ou Kruskal-Wallis quando a distribuição de ao menos um dos grupos em comparação não foi normal. Todas as análises de correlação foram realizadas através do teste de correlação paramétrico de Spearman e apresentadas com o programa *Tableau*. A diferença estatística foi considerada significativa quando o valor P foi  $< 0,05$ . As análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 e as figuras montadas com o programa Corel DRAW *Home and Student X6* (2012).

#### 4.9 *Descarte de resíduos*

Após o uso, os materiais plásticos descartáveis em contato com as amostras biológicas foram inativados por imersão em solução contendo 10% de hipoclorito (HClO) por 15 minutos e acondicionados em sacos plásticos, autoclavados e descartados em sacos específicos para o descarte de material biológico. O recolhimento dos resíduos biológicos e plásticos foi realizado pelo serviço específico da empresa Aborgama POA contratada pela UFRGS.

Os resíduos químicos foram identificados, separados e armazenados adequadamente em sala destinada para este fim e posteriormente recolhidos pela central de gerenciamento e tratamento de rejeitos químicos (CGTRQ) da UFRGS.

##### 4.9.1 *Ética*

Todos os procedimentos metodológicos previstos foram realizados em consonância com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa

envolvendo seres humanos (Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde) e as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos (CIOMS 2002; [HTTP://www.cioms.ch/](http://www.cioms.ch/)).

Para esse estudo foram utilizadas amostras previamente coletadas (projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CAAE: 26793114.0.0000.5347, Anexo 1), sob o protocolo nº 640.817; onde a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul colabora na qualidade de centro coparticipante (CAAE: 29576014.4.1001.5336, Anexo 2). Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) contendo a informação de que suas amostras seriam usadas para outros projetos além do projeto original inicial.

Essa dissertação foi feita com amostras previamente estocadas, sem a necessidade de coleta de novas amostras ou a inclusão de novos participantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados demográficos

Nossa amostra consistiu de indivíduos portadores de obesidade (n = 39) provenientes do COM do HSL e controles eutróficos (n = 27). Os dados referentes as características demográficas estão descritas na Tabela 2. Como esperado, observamos diferenças estatisticamente significativas (P < 0,05) entre os grupos quando comparados com respeito ao IMC e as diferentes comorbidades (síndrome metabólica, DMT2, HAS, dislipidemias e esteatose hepática). Como o grupo dos indivíduos portadores de obesidade apresentou idade significativamente maior que o grupo dos indivíduos controles (P = 0,0006), quando necessário, as análises foram ajustadas pela idade.

**Tabela 2. Características demográficas dos indivíduos de estudo\*.**

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

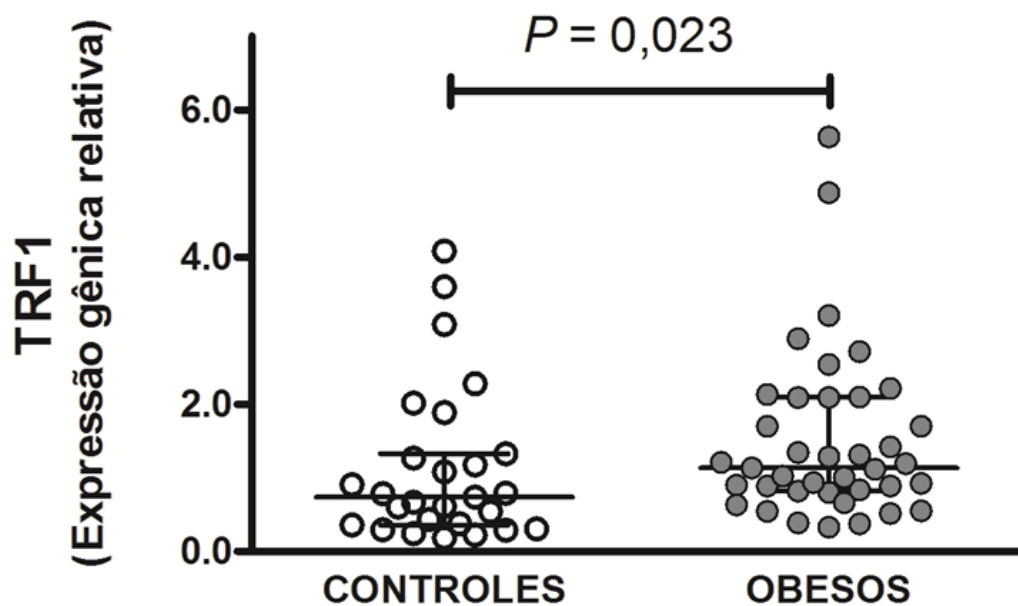
IQ = intervalo interquartil. Resultados expressos em número (percentagem) ou mediana (intervalo interquartil 25-75%). Os resultados em negrito indicam diferença significativa entre os grupos (nível de significância de 95%). Abreviaturas: IMC: índice de massa corporal. \*Esses dados foram previamente apresentados na dissertação de mestrado de Lucas K. Grun (<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/126844/000973447.pdf?sequence=1>).



## 5.2 Expressão gênica das proteínas do complexo *shelterin* e disquerina

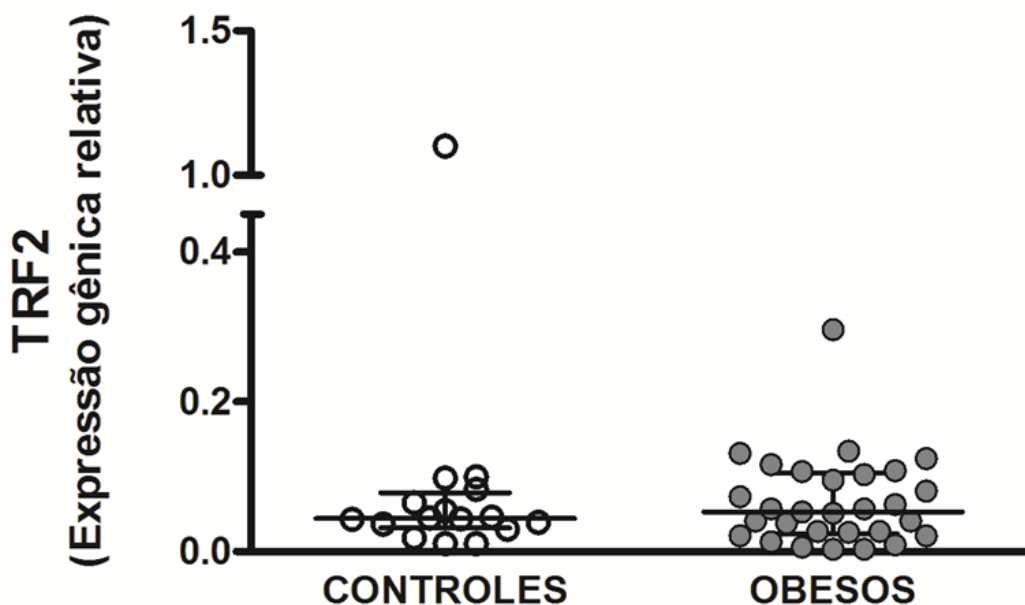
Estudos apontam que a proteína TRF1 regula a localização telomérica dos outros componentes do complexo *shelterin*, mantendo a estrutura tridimensional dos telômeros com capacidade funcional, além de regular negativamente a manutenção dos telômeros dependente de telomerase (Okamoto, Iwano et al. 2008).

Nossa análise estatística do nível de expressão do mRNA de TRF1 mostrou diferença estatística entre os grupos (Figura 5,  $P = 0,023$ ). Assim, em nosso estudo, indivíduos obesos apresentaram maiores níveis de expressão gênica de TRF1 quando comparados com seus pares eutróficos.



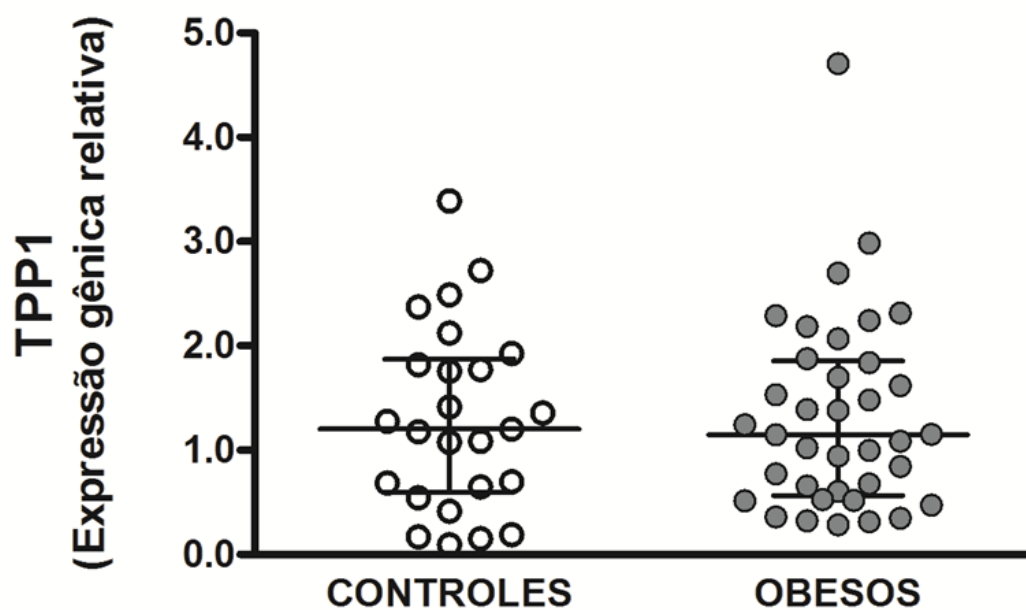
**Figura 5. Avaliação da expressão gênica relativa de TRF1 em indivíduos portadores de obesidade.** Houve diferença estatística entre os grupos analisados com maior grau de expressão verificada nos indivíduos portadores de obesidade ( $P = 0,023$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

Entre as proteínas do complexo *shelterin*, TRF2 tem mostrado ser um fator chave para a proteção dos telômeros, já que TRF2 expressa um domínio capaz de inibir a ativação da via ATM. Além disso, TRF2 parece reprimir recombinações não homologas nas regiões teloméricas (Picco, Coste et al. 2016). Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas na expressão gênica de TRF2 entre os indivíduos controles eutróficos e os indivíduos obesos (Figura 6,  $P = 0,785$ ). Quando comparadas com a expressão dos outros genes, a expressão de TRF2 foi significativamente menor nos dois grupos ( $P < 0,005$ ).



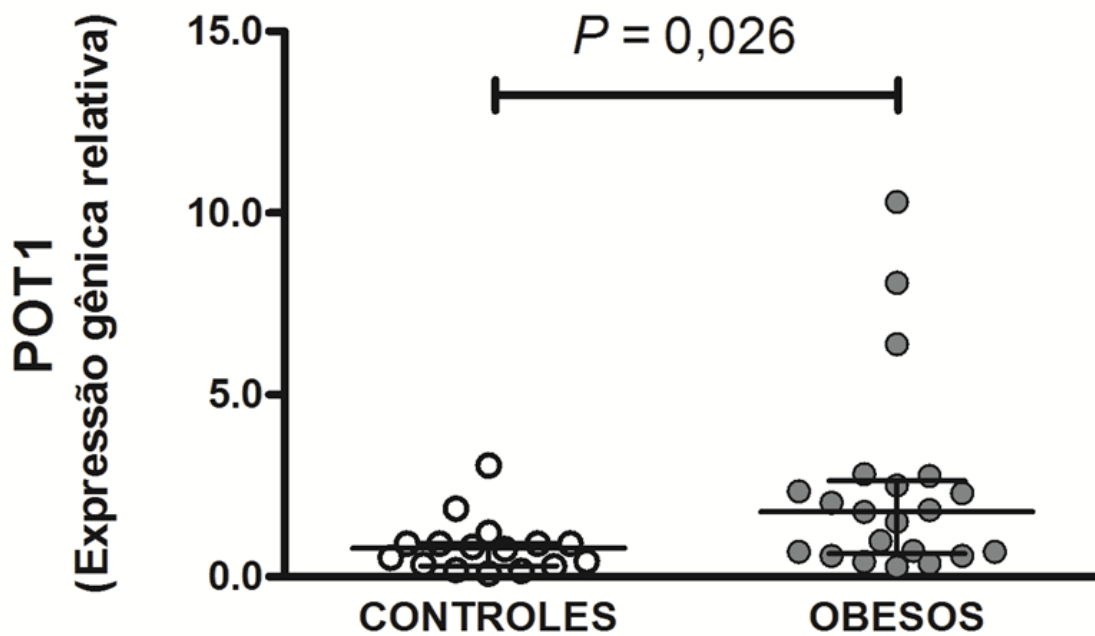
**Figura 6. Expressão gênica relativa similar de TRF2 em indivíduos obesos e controles eutróficos.** ( $P > 0,05$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

A proteína TPP1 fornece um reforço a ligação de POT1 sobre o DNA telomérico de fita simples. TPP1 parece ser a chave para o recrutamento da enzima telomerase de até a região telomérica (Rajavel, Orban et al. 2016). Em nosso trabalho, também não observamos diferenças na expressão gênica de TPP1 entre indivíduos obesos e eutróficos (Figura 7,  $P = 0,965$ ).



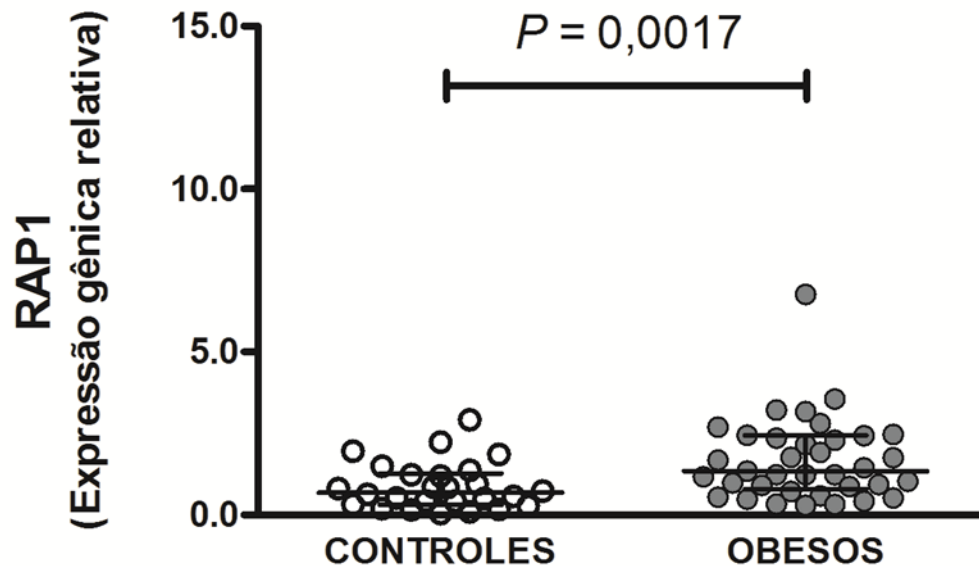
**Figura 7. Expressão gênica relativa similar de TPP1 entre indivíduos obesos e controles eutróficos.** ( $P > 0,05$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

Por outro lado, a proteína POT1 liga-se sobre os telômeros na região de fita simples telomérica e tem mostrado suprimir a ativação de respostas de reparo ao DNA telomérico as quais são indesejáveis nestas regiões. Nossas análises demonstraram que POT1 foi significativamente expressa em indivíduos portadores de obesidade, quando comparados com seus pares eutróficos (Figura 8,  $P = 0,026$ ).



**Figura 8. Avaliação da expressão gênica relativa da proteína POT1 em indivíduos obesos e controles eutróficos.** Houve diferença estatística entre os grupos analisados com o maior grau de expressão verificada nos indivíduos obesos ( $P = 0,026$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

Seguindo a mesma tendência, a expressão gênica de RAP1 mostrou-se significativamente elevada em indivíduos portadores de obesidade quando comparados com seus pares eutróficos (Figura 9,  $P = 0,0017$ ).

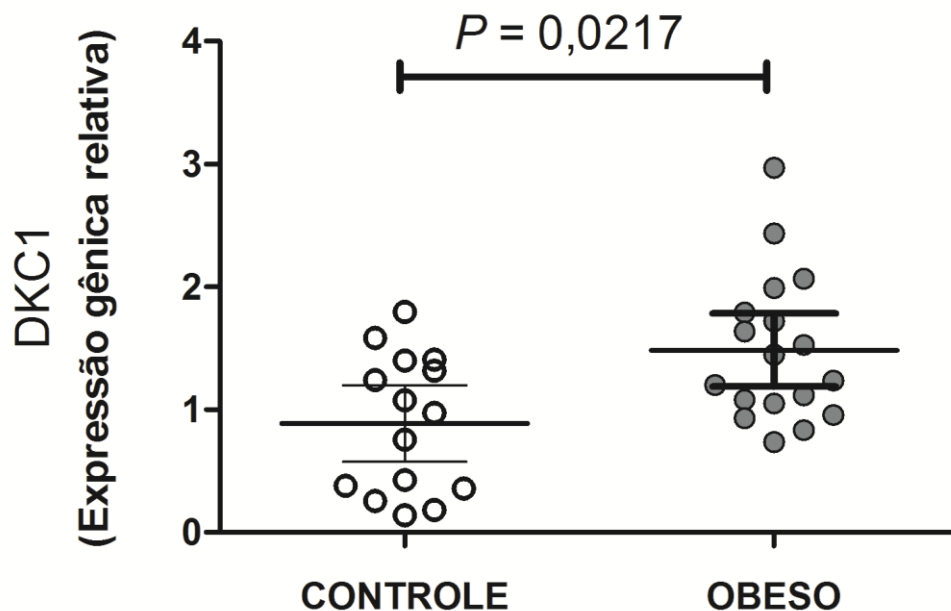


**Figura 9. Expressão gênica relativa aumentada de RAP1 em indivíduos portadores de obesidade.** Houve diferença estatística entre os grupos analisados com o maior grau de expressão verificada nos indivíduos obesos ( $P = 0,0017$ ; Teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

Por fim, avaliamos a expressão gênica de TIN2, cuja proteína TIN2, assegura a integridade do complexo *shelterin* sobre os telômeros interagindo diretamente com TRF1, TRF2 e TPP1. Entretanto, embora tenhamos desenhado 2 vezes oligonucleotídeos específicos, não conseguimos obter dados de PCR confiáveis.

Finalmente, a DKC1 é uma proteína conservada no processo de evolução. Embora não faça parte do complexo telomérico, participa da regulação da holoenzima telomerase (Angrisani, Vicidomini et al. 2014) e parece estar associada (ligada) a vários complexos proteicos independente dos processos nucleares.

Em nosso trabalho a expressão de DKC1 foi significativamente maior nos indivíduos portadores de obesidade quando comparados aos seus controles eutróficos (Figura 10,  $P = 0,0217$ ).



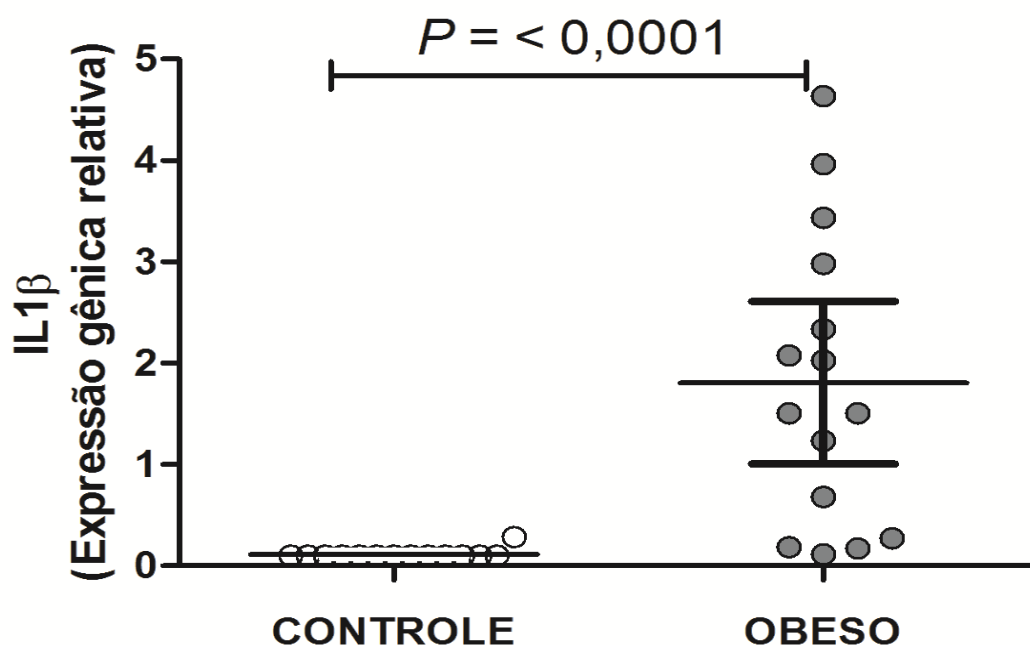
**Figura 10. Expressão gênica relativa aumentada de DCK1 em indivíduos obesos e controles eutróficos.** Houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $P = 0,0217$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

### 5.3 Perfil de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias

IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória secretada pelas PBMC e tem a particularidade de orquestrar fortemente o sistema imunológico em resposta a

insultos infecciosos e condições de inflamação estéril (Case, Shin et al. 2009; Ratner, Orning et al. 2017).

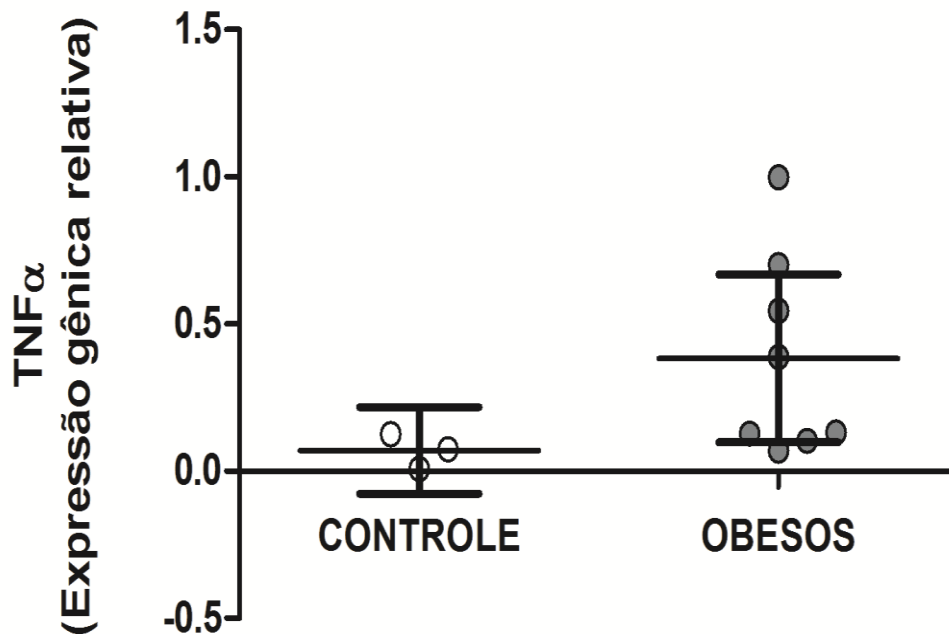
A análise de expressão gênica nas PBMC de nossos pacientes portadores de obesidade mostrou elevada expressão de IL-1 $\beta$  (Figura 11,  $P < 0,001$ ). Como esperado, a expressão de IL-1 $\beta$  em nosso grupo controle foi detectável em poucas amostras.



**Figura 11. Expressão gênica relativa de IL-1 $\beta$  aumentada em indivíduos portadores de obesidade.** ( $P < 0,001$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

Similar a IL-1 $\beta$ , durante processos inflamatórios a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é uma molécula chave para regular processos associados com a imunidade (Jorge, Andrade et al. 2016). TNF- $\alpha$  é comumente produzida e secretado por células endoteliais e células do sistema imune, bem como, células do tecido adiposo (Jorge, Andrade et al. 2016). Entretanto, TNF- $\alpha$  é uma proteína expressa

na fase aguda da inflamação. Por tal motivo, nossos resultados demonstraram a expressão gênica de TNF- $\alpha$  em poucas amostras sem diferença entre os grupos (Figura 12,  $P = 0,0848$ ).



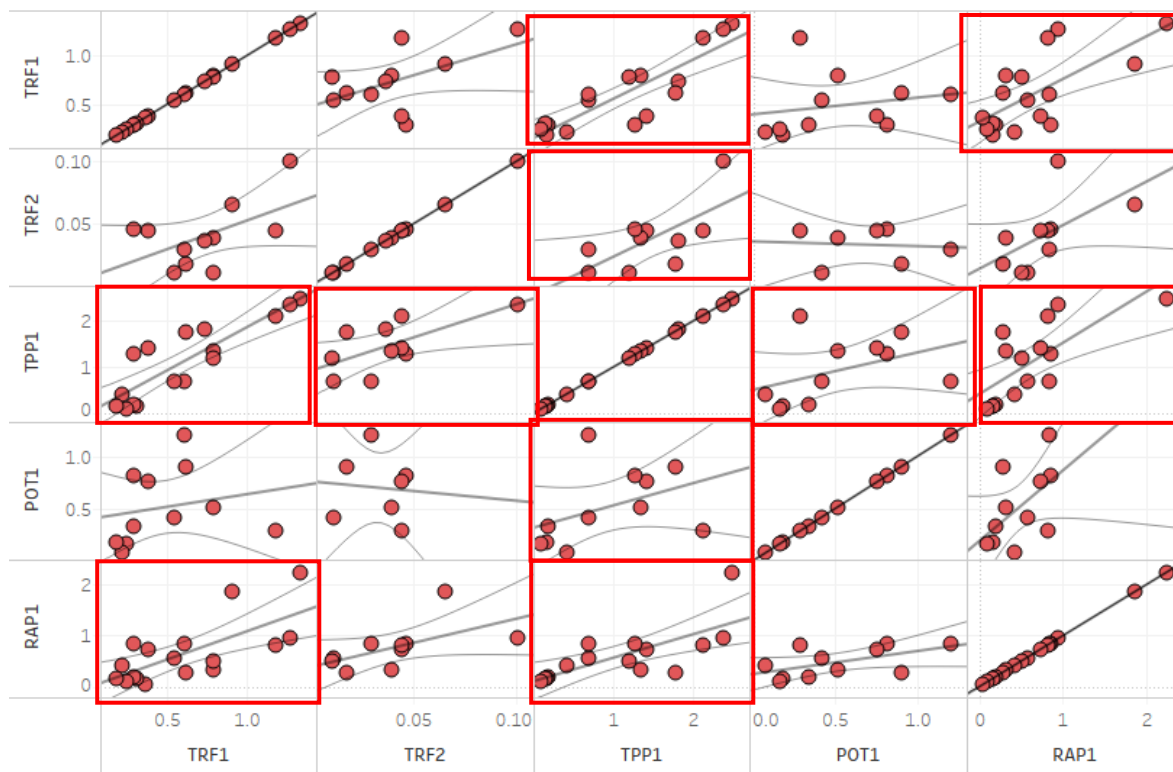
**Figura 12. Avaliação da expressão gênica relativa da proteína TNF- $\alpha$  em indivíduos obesos e controles eutróficos.** ( $P > 0,05$ ; teste estatístico de Mann-Whitney). Barras: Mediana (intervalo interquartil, 25-75%).

#### 5.4 Correlação entre genes do complexo *shelterin*, *DKC1*, comprimento de telômeros e citocinas inflamatórias

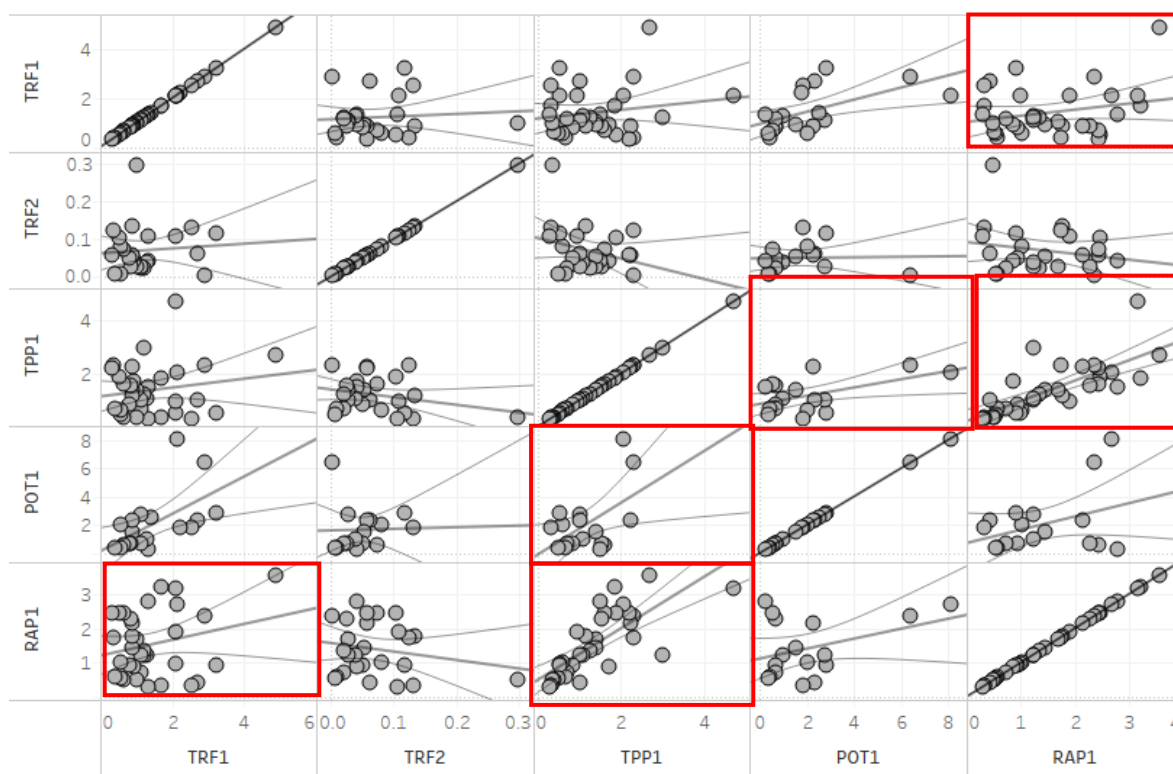
Com o intuito de verificar associações entre os diferentes genes do complexo *shelterin*, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a razão T/S como medida de comprimento de telômeros, analisamos as relações mediante análises de correlação de *Spearman* (Figura 13) nos indivíduos do grupo controle e nos indivíduos do grupo portadores de obesidade, por separado.



## CONTROLE



## OBESO

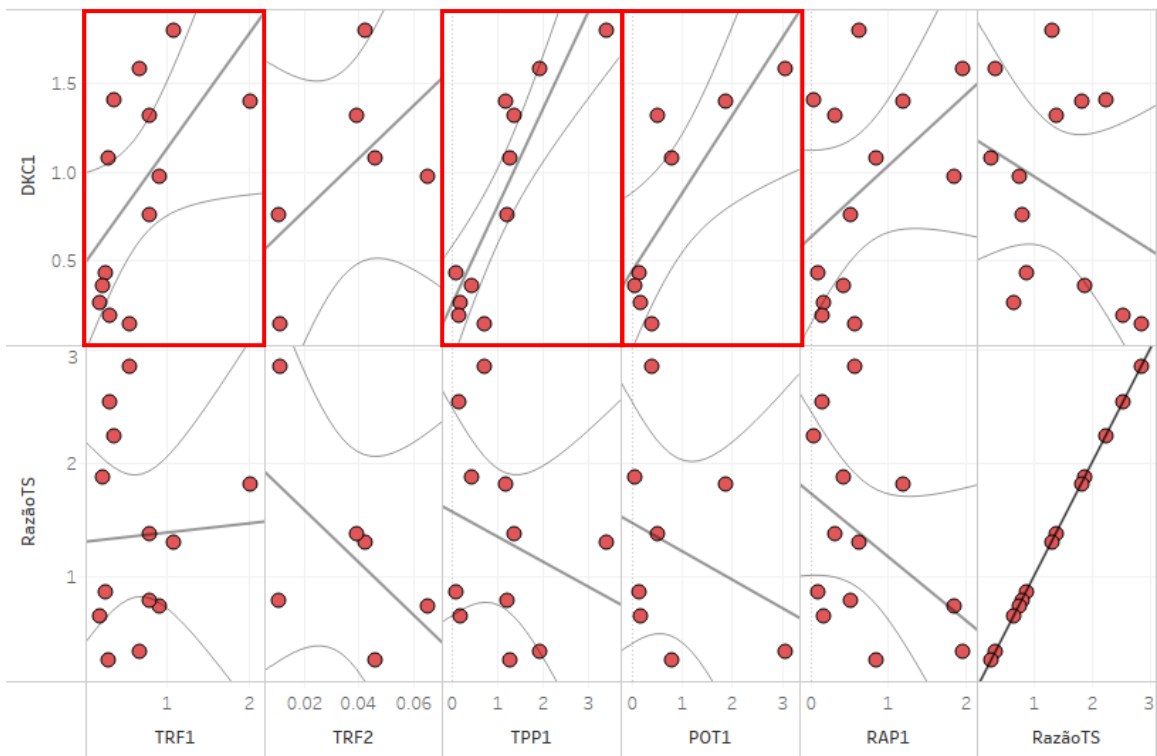


**Figura 13. Análise de correlação de Spearman entre as proteínas do complexo *shelterin* no grupo controle e no grupo obesos. As correlações significativas ( $P < 0,05$ ) estão indicadas por quadrados vermelhos.**

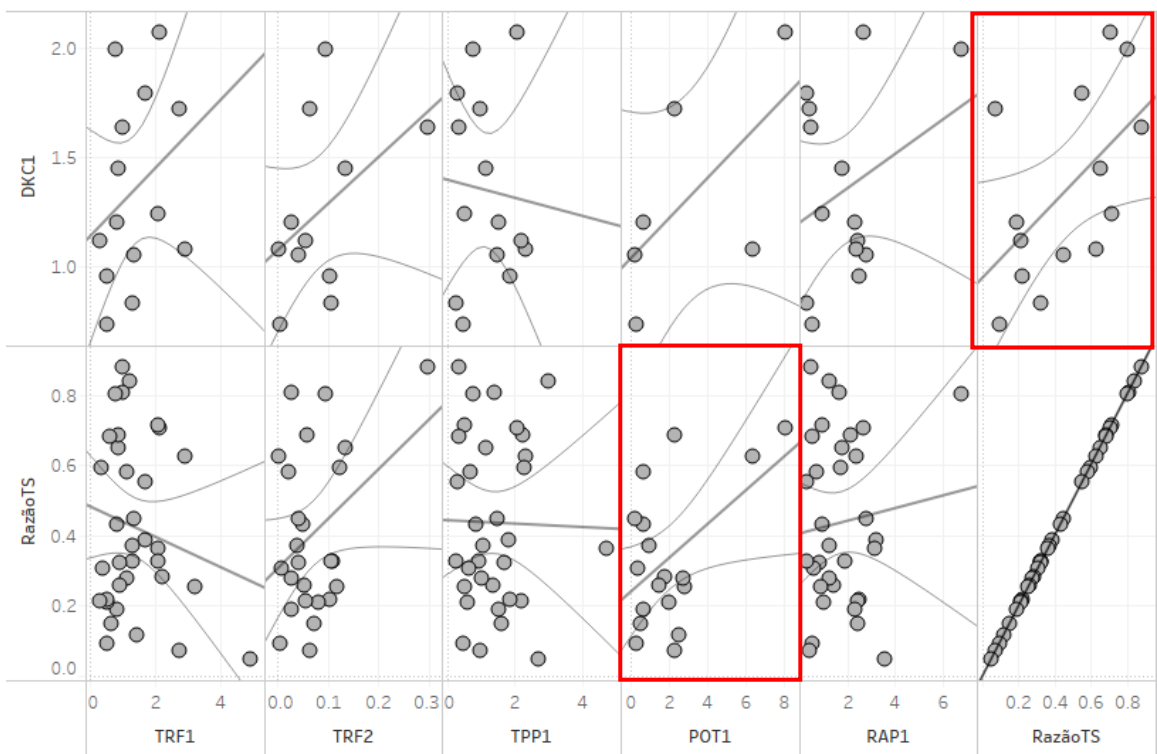
Os níveis de expressão gênica em indivíduos controles entre TRF1 e TPP1 ( $r^2 = 0,755$ ,  $P = < 0,0001$ ), TRF1 e RAP1 ( $r^2 = 0,484$ ;  $P = 0,002$ ); TRF2 e TPP1 ( $r^2 = 0,444$ ;  $P = 0,035$ ) e TPP1 e RAP1 ( $r^2 = 0,512$ ;  $P < 0,002$ ); apresentaram associações significativamente positivas (Figura 13, painel superior).

Quando observadas as mesmas associações no contexto da obesidade, observamos uma mudança no perfil de correlações. Observamos correlações positivas entre POT1 com TRF1 ( $r^2 = 0,325$ ;  $P = 0,01$ ) e com TPP1 ( $r^2 = 0,283$ ;  $P = 0,027$ ) e TPP1 e RAP1 ( $r^2 = 0,573$ ;  $P < 0,0001$ ). As demais correlações entre os componentes do complexo *shelterin* não foram significativas no grupo obesos (Figura 13, painel inferior).

CONTROLE-DKC1, TS



OBESO-DKC1, TS



**Figura 14. Análise de correlação de Spearman entre as proteínas do complexo *shelterin*, DKC1 e razão T/S no grupo controle e no grupo obesos. As correlações significativas ( $P < 0,05$ ) estão indicadas por quadrados vermelhos.**

Outra proteína que regula a atividade da enzima telomerase e participa do complexo holoenzima telomerase é a DKC1. DKC1 mostrou uma associação positiva com TRF1 e POT1 ( $r^2 = 0,316$ ;  $P = 0,045$  e  $r^2 = 0,630$ ;  $P = 0,018$ , respectivamente) no grupo controle. Somado a isso, a forte associação entre DKC1 e TPP1 ( $r^2 = 0,765$ ;  $P = 0,0004$ ) presente no grupo dos indivíduos controle foi perdida no grupo dos portadores da obesidade bem como as outras correlações de DKC1 vista no grupo controle (Figura 14).

Quando correlacionamos o comprimento dos telômeros (razão T/S) com a expressão gênica dos componentes do complexo *shelterin*, nenhuma correlação foi significativa no grupo controle (Figura 14, painel superior,  $P > 0,05$ ).

Não obstante, no grupo dos portadores de obesidade, a DKC1 apresentou uma associação positiva com a razão T/S ( $r^2 = 0,306$ ;  $P = 0,040$ ). O encurtamento dos telômeros observado nos indivíduos com obesidade mostrou uma forte associação com POT1 ( $r^2 = 0,247$ ;  $P < 0,035$ ) (Figura 14, painel inferior).

A IL-1 $\beta$  foi positivamente correlacionada com a expressão gênica de TRF1 ( $r^2 = 0,315$ ;  $P < 0,002$ ) e TPP1 ( $r^2 = 0,194$ ;  $P < 0,0028$ ). Essas correlações se perderam no grupo dos indivíduos portadores de obesidade. Devido ao limitado número de amostras com expressão de TNF- $\alpha$  não conseguimos fazer análises de correlação com outros parâmetros. Entretanto, dentro do grupo dos indivíduos portadores de obesidade com expressão de TNF- $\alpha$  ( $n = 8$ ), houve uma forte associação entre IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ( $r^2 = 0,694$ ;  $P = 0,010$ , dados não apresentados).

### PARTE III

## 6. DISCUSSÃO

Indivíduos portadores de obesidade apresentam, de forma prematura, características previamente descritas e associadas com o envelhecimento fisiológico, como a capacidade reduzida de lidar com diferentes insultos (agentes biológicos, físicos e químicos) e um estado pró-inflamatório crônico sistêmico aumentado. Nesse sentido, o estado de parainflamação não resolvido, promove um estado de senescência celular em adipócitos que pode impactar no funcionamento de diversos tecidos e pode comprometer a qualidade de vida e a expectativa de vida do organismo em geral.

A hipótese de senescência de células adiposas ressalta que nos indivíduos portadores de doenças metabólicas como a obesidade, a resolução da inflamação está atenuada, e a parainflamação, age como mecanismo de sustentação do processo inflamatório (Newsholme and de Bittencourt 2014). Associado a esse estado pró-inflamatório há um acúmulo de células senescentes que modificam seu fenótipo para o perfil SASP.

Em nosso trabalho, utilizamos PBMC de uma coorte formada por 39 indivíduos portadores de obesidade grau II e grau III, previamente descrita (<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/126844/000973447.pdf?sequence=1>). Dentro dos 39 participantes do grupo de portadores de obesidade, todos os participantes apresentam ao menos uma comorbidade (dislipidemia, DM2, esteatose hepática, HAS ou SM). Por outro lado, nesse mesmo trabalho, Grun e colaboradores demonstraram nas PBMC telômeros encurtados com uma correlação negativa quando associadas com idade e IMC (manuscrito em preparação).

Como dito anteriormente o comprimento dos telômeros tem sido associado com a idade biológica dos indivíduos saudáveis (Blasco 2007). Por outro lado, seu encurtamento acelerado, tem sido observado em diversas doenças crônicas, associado a estilos de vida pouco saudáveis e associado a eventos precoces de senescência celular. Da mesma forma, a frequência aumentada de células no estado senescente tem sido observada em indivíduos idosos ou associada com doenças crônicas (Alder, Guo et al. 2011; Kyoh, Venkatesan et al. 2013; Haycock, Heydon et al. 2014).

A literatura descreve 9 marcadores possivelmente associados com o envelhecimento dos organismos, dentro deles o encurtamento dos telômeros (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013).

A disfunção telomérica limita a capacidade proliferativa das células somáticas e induz eventos de senescência celular ou de apoptose. A disfunção telomérica pode ser consequência de falhas ou mutações presentes na enzima telomerase, como as relatadas nas telomeropatias anemia aplástica (AA) ou Disceratose congênita (DC) (Townsend, Dumitriu et al. 2014; Stella, Balestro et al. 2016).

Por outro lado, a disfunção telomérica em humanos pode ser consequência de deficiências presentes nas proteínas do complexo *shelterin* (Palm and de Lange 2008). Nesse sentido, trabalhos realizados em modelos experimentais de perda de função dos componentes do complexo *shelterin* tem demonstrado o declínio acentuado da capacidade regenerativa dos tecidos ou seu envelhecimento acelerado (Martinez, Thanasoula et al. 2010).

A utilização dos modelos experimentais em animais geneticamente modificados tem sido fundamental para o estabelecimento de um papel causal entre o encurtamento dos telômeros e o envelhecimento (Blasco, Lee et al. 1997; Armanios 2009; Armanios, Alder et al. 2009) ou a reativação da ação da enzima telomerase e a sobrevida aumentada (Jaskelioff, Muller et al. 2011). As proteínas do complexo *shelterin* e a enzima telomerase colaboram para o alcance de um tamanho telomérico determinado durante os eventos de proliferação celular. A coordenação entre as proteínas do complexo *shelterin*, seu recrutamento e a regulação da telomerase, variam nos diferentes tipos celulares ou em diferentes contextos patofisiológicos como exemplificado na figura 2.

Entretanto, não há dados na literatura que apresentem uma descrição completa dos componentes do complexo *shelterin* em PBMC, suas quantidades estequiométricas e sua inter-relação em contextos patológicos, presentes na obesidade.

Nossos dados demonstram uma expressão alterada e significativamente aumentada dos genes TRF1, POT1 e RAP1 do complexo *shelterin* e do gene DKC1 em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, quando comparados com seus pares eutróficos.

Dados da literatura sugerem que as proteínas do complexo *shelterin* TRF1, TRF2, TIN2 e POT1 participam de um mecanismo regulatório de retroalimentação negativa. TRF1 e TRF2 através de seus domínios tipo Myb associam-se com a porção telomérica de fita dupla e detectam as repetições de hexanucleotídeos (Chen, Yang et al. 2008). A superexpressão de TRF1 resulta na gradual e progressiva perda das repetições teloméricas mesmo em linhagens imortalizadas.



Entretanto, um mutante disfuncional de TRF1 permite a alongação dos telômeros, confirmando que TRF1 age como um regulador negativo (van Steensel and de Lange 1997). A superexpressão de TRF1 ou de TRF2 não afeta a expressão da enzima telomerase. Os autores têm proposto que tanto TRF1 como TRF2 impedem a ação da telomerase por serem as principais proteínas a favorecer a formação da estrutura tridimensional telomérica de *T-loop* que restringe a aproximação da enzima na porção telomérica (Smogorzewska, van Steensel et al. 2000).

A elevada expressão de TRF1 nas PBMC de indivíduos com obesidade da nossa coorte é consistente com as funções biológicas de TRF1 e as evidências publicadas na literatura. Entretanto, sua expressão não mostrou correlação com o encurtamento telomérico ( $P = 0,324$ ). A falta de correlação poderia ser explicada pelo mecanismo de ação da TRF1. Neste sentido, alguns autores salientam a existência de um fino controle de diversos fatores que participam na homeostase do comprimento dos telômeros gerenciados principalmente pela atividade da telomerase como um regulador positivo e TRF1 e TRF2 como reguladores negativos (Smogorzewska, van Steensel et al. 2000).

Em nosso cenário, a expressão gênica aumentada de TRF1 em PBMC associada com telômeros encurtados nos indivíduos portadores de obesidade está de acordo com os dados de (Smogorzewska, van Steensel et al. 2000), e consistente com a ideia da proteína TRF1 ter um papel como regulador negativo, aumentado em situações com telômeros encurtados como o observado na obesidade. Em linhagens celulares, células com telômeros longos recrutam grande quantidade de TRF1 sobre a região telomérica, o que favoreceria a formação da estrutura do *T-loop* restringindo a ação da telomerase. A inibição da ação da

telomerase levaria ao encurtamento progressivo dos telômeros com expressão elevada de TRF1 (McEachern and Blackburn 1995).

Estudos em humanos indicam que células linfoides tumorais (células com alto potencial proliferativo como as PBMC) (Panero, Alves-Paiva et al. 2016) e amostras de tecido humano de tumor de cérebro (Butler, Hines et al. 2012) também apresentaram padrão similar ao visto em nosso trabalho com elevação de TRF1 quando os telômeros estavam encurtados.

Embora as evidências sugiram que tanto TRF1 como TRF2 compartilham uma mesma função regulatória negativa (Chen, Yang et al. 2008) nossos dados demonstram que TRF2 está significativamente reduzida nos dois grupos estudados, quando comparadas com o perfil gênico dos outros genes do mesmo grupo, controle ou portadores de obesidade, mas não entre os diferentes grupos. Esse resultado sugere que TRF2 deve ter um mecanismo de controle diferente que o presente em TRF1. A expressão diminuída de TRF2 já foi demonstrada em pacientes com desordens hematológicas como gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) ou mieloma múltiplo (MM) (Panero, Arbelbide et al. 2010). Estudos adicionais serão necessários para determinar a real contribuição da proteína TRF2 na homeostasia telomérica ou no contexto de obesidade.

Nossos resultados também demonstraram POT1 aumentada nas PBMC do grupo dos indivíduos portadores de obesidade e acompanhou o perfil apresentado por TRF1. POT1 demonstrou uma associação positiva com TRF1 e TPP1 ( $r^2 = 0,325$ ;  $P < 0,0,01$  e  $r^2 = 0,283$   $P < 0,027$ , respectivamente). Ao igual que TRF1 e TRF2, a literatura descreve um papel regulador negativo de POT1 sobre o alongamento dos telômeros sem interação com a atividade da enzima telomerase.

Similar ao mecanismo proposto para TRF1 e TRF2, POT1 potencialmente inibiria a alocação da telomerase sobre os telômeros e evitaria sua interação com outras proteínas e com os telômeros (Takai, Jenkinson et al. 2016).

O promotor de POT1 apresenta um elemento de união para o NF- $\kappa$ B. Portanto, POT1 também pode ser regulada pela ativação do NF- $\kappa$ B, o que sugere uma função associada com a inflamação. Em linhagem de macrófagos de roedores, POT1 mostrou-se presente tanto na porção telomérica quanto no citosol, demonstrando funções celulares extra-teloméricas. No citosol destas células, a variante de roedores POT1b parece associar-se com a proteína Rab5 e inibir parcialmente o mecanismo de endocitose de bactérias assim como também diminuir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com concomitante diminuição da produção de óxido nítrico, molécula essencial para função bactericida destas células (Hagiwara, Komatsu et al. 2013). Neste sentido, a elevação gênica de POT1 presente em PBMC vista nos indivíduos portadores de obesidade também poderia comprometer funções do sistema imune e contribuir com a aumentada suscetibilidade a infecções bacterianas, como observado em indivíduos portadores de obesidade (Hagiwara, Komatsu et al. 2013; Sohrab, Kamal et al. 2017).

Ainda, corroborando com nossos resultados, estudos demonstram que TRF1 apresenta um perfil de expressão gênica diminuída similar a RAP1, em linhagens celulares de telômeros curtos, ou seja, a quantidade de TRF1 e RAP1 na célula reflete um menor comprimento dos telômeros (McEachern and Blackburn 1995; van Steensel and de Lange 1997; Smogorzewska, van Steensel et al. 2000). Como consequência os telômeros de determinada linhagem celular eventualmente convergirão a um comprimento telomérico médio. Assim, os autores salientam que

um telômero em homeostase possui TRF1 o suficiente para permitir um comprimento apropriado dos telômeros mantido pela telomerase (McEachern and Blackburn 1995; van Steensel and de Lange 1997; Smogorzewska, van Steensel et al. 2000).

Em nosso trabalho, observamos uma elevada expressão de RAP1 sem associação significativa ( $P = 0,592$ ) com o encurtamento prematuro dos telômeros no grupo obesos. A proteína RAP1 associa-se aos telômeros através de uma interação com TRF2. Entretanto, nossos resultados demonstraram uma expressão de TRF2 diminuída e aumento de RAP1 nas mesmas amostras, sugerindo que RAP1 poderia exercer funções adicionais as observadas na homeostase telomérica. Nesse sentido, Hsiangling Teo e colaboradores identificaram funções telômeros-independentes e combinadas com a sinalização do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (Teo, Ghosh et al. 2010). A interação no citoplasma de RAP1 com o complexo inibidor quinase I $\kappa$ B (IKK1/2 ou NEMO) demonstrou ser um passo essencial na ativação do NF- $\kappa$ B com subsequente ativação dos genes alvos de controle do NF- $\kappa$ B (Teo, Ghosh et al. 2010).

A região promotora de RAP1 apresenta sítios de ligação a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B (Teo, Ghosh et al. 2010). Em células HEK293 os autores relataram um mecanismo de retroalimentação positiva. Assim, após um estímulo pró-inflamatório, há ativação de NF- $\kappa$ B com translocação ao núcleo e ligação de p65 no promotor de RAP1 estimulando sua expressão e por conseguinte aumentando os níveis de RAP1, os quais associados ao complexo IKK1/2-NF- $\kappa$ B alimentam a propagação do estímulo inflamatório (Teo, Ghosh et al. 2010). A inibição de RAP1 por RNA de interferência em linhagem de macrófago murino mostrou a redução de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 e MCP1 e aumento de fatores reguladores como IL-10 e I $\kappa$ B $\alpha$ , dependentes de

p65 (Cai, Sukhova et al. 2015). Um aumento de RAP1 também foi descrito em indivíduos com doença inflamatória crônica de origem autoimune como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Zhou, Qing et al. 2011).

Como esperado, nossos resultados detectaram expressão aumentada da interleucina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  nas PBMC do grupo dos indivíduos portadores de obesidade. Desta forma, a elevada expressão de RAP1 e IL-1 $\beta$ , alvos de controle do NF- $\kappa$ B, poderia estar sendo sustentada por um mecanismo de retroalimentação positiva, presente a nível sistêmico e local em indivíduos portadores de obesos. Todo este processo poderia ser decorrente do desbalanço pró-inflamatório associado ao tecido adiposo. A proteína RAP1 aumentada em obesos, poderia representar um mecanismo molecular chave, adicional, de conexão entre o envelhecimento precoce observado nos indivíduos portadores de obesidade e o SASP. Assim, RAP1 aumentada contribuiria para o menor comprimento telomérico, alteração do perfil de expressão de proteínas teloméricas e secreção de citocinas pró-inflamatórias via sinalização de NF- $\kappa$ B.

Nesse sentido, resultados ainda não publicados de nosso grupo demonstram a secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias reguladas por NF- $\kappa$ B (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) em cultura de PBMC dos indivíduos portadores de obesidade, as quais poderiam potencializar o ciclo de parainflamação alimentado também por RAP1 (Parisi, MM., manuscrito submetido).

Linhagens de câncer de mama tratadas com ativadores clássicos de NF- $\kappa$ B aumentaram a expressão de TRF1, TIN2 e POT1 em cerca de 4 a 6,5 vezes (Butler, Hines et al. 2012). Assim, a parainflamação presente nos indivíduos com obesidade oriunda do tecido adiposo poderia ser responsável pela ativação do NF-

$\kappa$ B, o qual levaria a expressão aumentada de RAP1. A elevação crônica de RAP1 via NF- $\kappa$ B amplificaria o ciclo de elevada expressão de RAP1, TRF1 e POT1 como os verificados no nosso trabalho.

Além da associação de RAP1 com a inflamação via NF- $\kappa$ B, Martínez e Blasco também demonstraram elementos de união para RAP1 presente nos promotores de fatores de transcrição chaves no metabolismo de lipídeos como o receptor ativado por proliferador de peroxissomo  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) e o coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\alpha$ 1 (PGC-1 $\alpha$ ) (Martinez, Gomez-Lopez et al. 2013). Entretanto, contrário aos nossos resultados, camundongos nocautes para RAP1 (RAP1<sup>-/-</sup>) apresentaram desenvolvimento prematuro da obesidade e comorbidades associadas (Martinez, Gomez-Lopez et al. 2013).

PPARs possuem vários papéis em processos patofisiológicos incluindo diferenciação celular, tumorigenese e metabolismo de lipídios, proteínas e carboidrato. Entretanto, em cada tipo celular eles parecem favorecer processos diferentes celulares diferentes, além disso, ligantes de PPARs incluem ácidos graxos e seus derivados (Derosa, Sahebkar et al. 2017).

PGC-1 $\alpha$  é um alvo de PPARs e ainda, sua expressão regula atividade de PPARs. Somado a isso, recentemente o conjunto de genes mais fortemente induzidos por PGC-1 $\alpha$  foram os de células mielóides (Rowe, Raghuram et al. 2014) 25009290. Desta forma, RAP1 aumentada ainda poderia estar envolvida na regulação desta via nas células analisadas neste trabalho.

Por tanto, para explicar nossos resultados observados nos indivíduos portadores de obesidade seria interessante quantificar a expressão proteica de RAP1 e dos fatores associados ao catabolismo de lipídeos PPAR $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$ .

Embora a DKC1 não faça parte do complexo *shelterin*, também participa da regulação da homeostase e do comprimento dos telômeros mediante a estabilização da telomerase. A DKC1 está associada com a subunidade TERC (TR) que fornece o molde de RNA (Li, Wu et al. 2003; Cohen, Graham et al. 2007). Em humanos DKC1 e hTERC (do inglês *human telomerase reverse transcriptase*) são constitutivamente expressas, entretanto, a atividade da enzima telomerase é dependente da subunidade hTERT (do inglês *human telomerase RNA complement*), a qual tem a expressão altamente regulada durante o desenvolvimento dos tecidos humanos (Li, Wu et al. 2003; Cohen, Graham et al. 2007; Penzo, Ludovini et al. 2015).

Nossos resultados demonstraram maior expressão gênica de DKC1 no grupo dos portadores de obesidade e seus níveis de expressão gênica de DKC1 foram positivamente correlacionados com telômeros maiores ( $r^2 = 0,305$ ;  $P = 0,040$ ). DKC1 também mostrou uma associação positiva com TRF1 e POT1 ( $r^2 = 0,316$ ;  $P = 0,04$  e  $r^2 = 0,630$ ;  $P = 0,01$ , respectivamente) somente no grupo controle. Tanto TRF1 como POT1 têm sido descritos como reguladores negativos do comprimento de telômeros. Ao passo que o perfil de expressão das proteínas teloméricas parece sofrer desregulação no contexto da obesidade, salientamos que a associação de TRF1 e POT1 com DKC1 foram perdidas no grupo dos portadores de obesidade, podendo a DKC1 estar envolvida com um importante papel na homeostase telomérica. Esses resultados sugerem que, a regulação coordenada presente na expressão gênica de TRF1 e POT1 é diferente da que regula a expressão de DKC1 no contexto da obesidade.

Níveis elevados de DKC1 também foram relatados em células neoplásicas independentemente da atividade da telomerase ou da expressão de hTERT (Alawi,

Lin et al. 2011; Liu, Zhang et al. 2012; Panero, Alves-Paiva et al. 2016). A DKC1 desempenha um papel essencial na biogênese ribossomal e apresenta forte correlação com a taxa de proliferação celular. Embora em nosso estudo não tenhamos quantificado proliferação celular, a literatura sustenta a existência de uma proliferação de precursores da medula óssea e ativação das células da linhagem hematopoiética aumentada, presente a nível periférico nas PBMC de obesos (Bellows, Zhang et al. 2011; Sica, Erreni et al. 2015).

Mutações presentes no gene da DKC1, como na doença DC ligada ao X, salientam o papel fundamental da DKC1 na regulação do controle da atividade da telomerase e sugerem que o encurtamento dos telômeros observados nos pacientes com DC poderia ser a consequência da associação diminuída entre o componente de RNA TERC e a proteína DKC1 (Tamary and Alter 2007).

Nosso estudo não permitiu fazer análises de correlação entre variáveis clínicas como DMT2, esteatose hepática, HAS e SM e comprimento de telômeros (razão T/S), devido ao número reduzido de participantes no grupo de indivíduos portadores de obesidade presentes em cada subgrupo.

Em resumo, nossos achados demonstram a importância do complexo *shelterin* e de proteínas acessórias como DKC1, no contexto da manutenção da regulação telomérica. Nossos resultados salientam a complexa e intrincada rede de fatores associados e desregulados durante os processos fisiopatológicos do envelhecimento como os presentes na obesidade. Estudos adicionais serão necessários acrescentando novos fatores para determinar a complexa regulação que determina o comprimento dos telômeros no estado fisiopatológico da obesidade.



## PARTE IV

## 7. CONCLUSÕES

1. Nossos achados demonstram uma expressão gênica aumentada dos componentes do complexo *shelterin* (TRF1, POT1 e RAP1) e disquerina, em indivíduos portadores da obesidade;

2. Nossos resultados também demonstraram expressão aumentada da IL-1 $\beta$ , mas não do TNF- $\alpha$  em indivíduos portadores da obesidade;

3. Em indivíduos eutróficos TPP1 apresentou correlação positiva com os demais genes analisados (TRF1, TRF2, POT1 e RAP1).

4. Em indivíduos eutróficos DKC1 apresentou forte correlação positiva com TRF1, TPP1 e POT1. Porém, no contexto da obesidade DKC1 perdeu todas as correlações com as proteínas teloméricas;

5. Somente a expressão gênica de DKC1 foi positivamente correlacionada com o comprimento dos telômeros em indivíduos portadores de obesidade, mas não no grupo controle;

6. A expressão gênica do complexo *shelterin per se* não foi capaz de explicar o desfecho observado de telômeros encurtados em indivíduos portadores de obesidade, sugerindo que fatores adicionais devem estar envolvidos na regulação do comprimento dos telômeros.

## 8. PERSPECTIVAS

1. Determinar a expressão gênica da telomerase subunidade hTERT;
2. Determinar a expressão gênica de TIN2;
3. Determinar o imunoconteúdo de RAP1 (nuclear e citoplasmática em PBMC);
4. Determinar a localização de RAP1 nos cromossomos;
5. Determinar a expressão de outros componentes envolvidos na homeostase telomérica como genes associados com o processo de replicação (RPA1) e vias de reparo (MRE11-RAD50-NBS1) que também possam ser importantes e participar e regular a homeostase telomérica;
6. Identificar via análises de bioinformática genes adicionais envolvidos com a homeostase telomérica e construir uma rede de interação gênica.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1998). "Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health." *Obes Res* **6 Suppl 2**: 51S-209S.
- Abreu, E., E. Aritonovska, et al. (2010). "TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo." *Mol Cell Biol* **30**(12): 2971-2982.
- Alawi, F., P. Lin, et al. (2011). "Correlation of dyskerin expression with active proliferation independent of telomerase." *Head Neck* **33**(7): 1041-1051.
- Alder, J. K., N. Guo, et al. (2011). "Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(8): 904-912.
- Allsopp, R. C. (1996). "Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA." *Exp Gerontol* **31**(1-2): 235-243.
- Angrisani, A., R. Vicidomini, et al. (2014). "Human dyskerin: beyond telomeres." *Biol Chem* **395**(6): 593-610.
- Armanios, M. (2009). "Syndromes of telomere shortening." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**: 45-61.
- Armanios, M., J. K. Alder, et al. (2009). "Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging." *Am J Hum Genet* **85**(6): 823-832.
- Armanios, M. and E. H. Blackburn (2012). "The telomere syndromes." *Nat Rev Genet* **13**(10): 693-704.
- Baker, D. J., T. Wijshake, et al. (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." *Nature* **479**(7372): 232-236.
- Bandaria, J. N., P. Qin, et al. (2016). "Shelterin Protects Chromosome Ends by Compacting Telomeric Chromatin." *Cell* **164**(4): 735-746.
- Bandera, E. V., G. Maskarinec, et al. (2015). "Racial and ethnic disparities in the impact of obesity on breast cancer risk and survival: a global perspective." *Adv Nutr* **6**(6): 803-819.
- Barker, N., S. Bartfeld, et al. (2010). "Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs." *Cell Stem Cell* **7**(6): 656-670.
- Baumann, P. and T. R. Cech (2001). "Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans." *Science* **292**(5519): 1171-1175.
- Bellows, C. F., Y. Zhang, et al. (2011). "Influence of BMI on level of circulating progenitor cells." *Obesity (Silver Spring)* **19**(8): 1722-1726.
- Blasco, M. A. (2007). "Telomere length, stem cells and aging." *Nat Chem Biol* **3**(10): 640-649.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, et al. (1997). "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA." *Cell* **91**(1): 25-34.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* **279**(5349): 349-352.
- Bogl, L. H., S. M. Kaye, et al. (2016). "Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach." *Metabolism* **65**(3): 111-121.
- Brandacher, G., E. Hoeller, et al. (2007). "Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player?" *Curr Drug Metab* **8**(3): 289-295.
- Butler, K. S., W. C. Hines, et al. (2012). "Coordinate regulation between expression levels of telomere-binding proteins and telomere length in breast carcinomas." *Cancer Med* **1**(2): 165-175.
- Cai, Y., G. K. Sukhova, et al. (2015). "Rap1 induces cytokine production in pro-inflammatory macrophages through NFkappaB signaling and is highly expressed in human atherosclerotic lesions." *Cell Cycle* **14**(22): 3580-3592.
- Calyniuk, B., E. Grochowska-Niedworok, et al. (2016). "The effectiveness of the low energy diet in overweight and obese adults." *Rocz Panstw Zakl Hig* **67**(2): 137-146.

- Case, C. L., S. Shin, et al. (2009). "Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*." *Infect Immun* **77**(5): 1981-1991.
- Cervantes-Villagrana, R. D., A. R. Cervantes-Villagrana, et al. (2014). "[Signaling mechanisms involved in resolution of inflammation]." *Gac Med Mex* **150**(5): 440-449.
- Chen, S., F. Yeh, et al. (2014). "Short leukocyte telomere length is associated with obesity in American Indians: the Strong Heart Family study." *Aging (Albany NY)* **6**(5): 380-389.
- Chen, Y., Y. Yang, et al. (2008). "A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins." *Science* **319**(5866): 1092-1096.
- Chiang, Y. J., S. H. Kim, et al. (2004). "Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6631-6634.
- Choi, K. H., A. S. Farrell, et al. (2011). "Characterization of the DNA binding specificity of Shelterin complexes." *Nucleic Acids Res* **39**(21): 9206-9223.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." *J Lipid Res* **46**(11): 2347-2355.
- Cohen, S. B., M. E. Graham, et al. (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells." *Science* **315**(5820): 1850-1853.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, et al. (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): 2853-2868.
- Costa, A. G., M. D. Walker, et al. (2013). "Circulating sclerostin levels and markers of bone turnover in Chinese-American and white women." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(12): 4736-4743.
- Dalby, A. B., C. Hofr, et al. (2015). "Contributions of the TEL-patch amino acid cluster on TPP1 to telomeric DNA synthesis by human telomerase." *J Mol Biol* **427**(6 Pt B): 1291-1303.
- Dalvand, S., J. Koohpayehzadeh, et al. (2015). "Assessing factors related to waist circumference and obesity: application of a latent variable model." *J Environ Public Health* **2015**: 893198.
- De Meyer, T., E. R. Rietzschel, et al. (2011). "Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends?" *Ageing Res Rev* **10**(2): 297-303.
- Derosa, G., A. Sahebkar, et al. (2017). "THE Role of Various Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands in Clinical Practice." *J Cell Physiol*.
- Eren, M., A. E. Boe, et al. (2014). "PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in *Klotho* mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): 7090-7095.
- Falkner, B., S. DeLoach, et al. (2013). "High risk blood pressure and obesity increase the risk for left ventricular hypertrophy in African-American adolescents." *J Pediatr* **162**(1): 94-100.
- Figueroa, A. L., R. A. Takx, et al. (2016). "Relationship Between Measures of Adiposity, Arterial Inflammation, and Subsequent Cardiovascular Events." *Circ Cardiovasc Imaging* **9**(4): e004043.
- Franceschi, C., M. Capri, et al. (2007). "Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans." *Mech Ageing Dev* **128**(1): 92-105.
- Frescas, D. and T. de Lange (2014). "Binding of TPP1 protein to TIN2 protein is required for POT1a,b protein-mediated telomere protection." *J Biol Chem* **289**(35): 24180-24187.
- Frescas, D. and T. de Lange (2014). "TRF2-tethered TIN2 can mediate telomere protection by TPP1/POT1." *Mol Cell Biol* **34**(7): 1349-1362.
- Garcia-Beccaria, M., P. Martinez, et al. (2015). "Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage." *EMBO Mol Med* **7**(7): 930-949.
- Gomez, E. J. (2015). "Understanding the United States and Brazil's response to obesity: institutional conversion, policy reform, and the lessons learned." *Global Health* **11**: 24.
- Greider, C. W. (2010). "Telomerase discovery: the excitement of putting together pieces of the puzzle (Nobel lecture)." *Angew Chem Int Ed Engl* **49**(41): 7422-7439.

- Hagiwara, M., T. Komatsu, et al. (2013). "POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5." Biochem Biophys Res Commun **439**(3): 413-417.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-460.
- Haycock, P. C., E. E. Heydon, et al. (2014). "Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis." BMJ **349**: g4227.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Henriques, C. M. and M. G. Ferreira (2012). "Consequences of telomere shortening during lifespan." Curr Opin Cell Biol **24**(6): 804-808.
- Hockemeyer, D., W. Palm, et al. (2008). "Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita." Genes Dev **22**(13): 1773-1785.
- Ishii, T., A. M. Wallace, et al. (2006). "Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients." Eur Respir J **27**(2): 300-306.
- Izano, M., E. K. Wei, et al. (2016). "Chronic inflammation and risk of colorectal and other obesity-related cancers: The health, aging and body composition study." Int J Cancer **138**(5): 1118-1128.
- Jacobs, J. J. (2013). "Loss of telomere protection: consequences and opportunities." Front Oncol **3**: 88.
- Jaskelioff, M., F. L. Muller, et al. (2011). "Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice." Nature **469**(7328): 102-106.
- Jones, D. A., S. L. Prior, et al. (2014). "Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes." Diabetes Res Clin Pract **106**(3): 627-633.
- Jorge, A. S., J. M. Andrade, et al. (2016). "Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity." Obes Res Clin Pract.
- Karaman, A., H. Aydin, et al. (2015). "DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome." Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen **782**: 30-35.
- Koliada, A. K., D. S. Krasnenkov, et al. (2015). "Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator?" Front Genet **6**: 82.
- Konishi, A., T. Izumi, et al. (2016). "TRF2 Interacts with Core Histones to Stabilize Chromosome Ends." J Biol Chem.
- Krishnamurthy, J., M. R. Ramsey, et al. (2006). "p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential." Nature **443**(7110): 453-457.
- Kyoh, S., N. Venkatesan, et al. (2013). "Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity." J Allergy Clin Immunol **132**(2): 480-482 e482.
- Li, C., M. Y. Wu, et al. (2003). "Correlation between expression of human telomerase subunits and telomerase activity in esophageal squamous cell carcinoma." World J Gastroenterol **9**(11): 2395-2399.
- Liu, B., J. Zhang, et al. (2012). "Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis." PLoS One **7**(8): e43147.
- 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.
- Loayza, D., H. Parsons, et al. (2004). "DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites." J Biol Chem **279**(13): 13241-13248.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, et al. (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.

- Lubrano, C., G. Valacchi, et al. (2015). "Integrated Haematological Profiles of Redox Status, Lipid, and Inflammatory Protein Biomarkers in Benign Obesity and Unhealthy Obesity with Metabolic Syndrome." *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 490613.
- Malaquin, N., C. Vercamer, et al. (2013). "Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis." *PLoS One* **8**(5): e63607.
- Malin, S. K. and S. R. Kashyap (2016). "Type 2 Diabetes Treatment in the Patient with Obesity." *Endocrinol Metab Clin North Am* **45**(3): 553-564.
- Martinez, P., G. Gomez-Lopez, et al. (2013). "RAP1 protects from obesity through its extratelomeric role regulating gene expression." *Cell Rep* **3**(6): 2059-2074.
- Martinez, P., G. Gomez-Lopez, et al. (2016). "A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance." *Aging Cell*.
- Martinez, P., M. Thanasoula, et al. (2010). "Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites." *Nat Cell Biol* **12**(8): 768-780.
- Martinez, P., M. Thanasoula, et al. (2009). "Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice." *Genes Dev* **23**(17): 2060-2075.
- Mattar, S. G. (2008). "Lifting the unbearable weight of morbid obesity." *Ann Surg* **247**(1): 28-29.
- McEachern, M. J. and E. H. Blackburn (1995). "Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations." *Nature* **376**(6539): 403-409.
- Minamino, T. and I. Komuro (2007). "Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis." *Circ Res* **100**(1): 15-26.
- Mundstock, E., H. Zatti, et al. (2015). "Effects of Physical Activity in Telomere Length: Systematic Review and Meta-Analysis." *Ageing Res Rev*.
- Nandakumar, J., C. F. Bell, et al. (2012). "The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity." *Nature* **492**(7428): 285-289.
- Newsholme, P. and P. I. de Bittencourt, Jr. (2014). "The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**(4): 295-305.
- O'Sullivan, R. J. and J. Karlseder (2010). "Telomeres: protecting chromosomes against genome instability." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 171-181.
- Oh, D. Y., H. Morinaga, et al. (2012). "Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice." *Diabetes* **61**(2): 346-354.
- Ohanna, M., S. Giuliano, et al. (2011). "Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS)." *Genes Dev* **25**(12): 1245-1261.
- Okamoto, K., T. Iwano, et al. (2008). "Distinct roles of TRF1 in the regulation of telomere structure and lengthening." *J Biol Chem* **283**(35): 23981-23988.
- Ouchi, N. (2011). "[Obesity: Progress in diagnosis and treatment; Topics, IV. Recent topics; 3. Obesity and new secretory factors; 2) Sfrp 5 acts as a novel adipocytokine that affects metabolic function]." *Nihon Naika Gakkai Zasshi* **100**(4): 1002-1007.
- Palm, W. and T. de Lange (2008). "How shelterin protects mammalian telomeres." *Annu Rev Genet* **42**: 301-334.
- Panero, J., R. M. Alves-Paiva, et al. (2016). "Acquired TERT promoter mutations stimulate TERT transcription in mantle cell lymphoma." *Am J Hematol* **91**(5): 481-485.
- Panero, J., J. Arbelbide, et al. (2010). "Altered mRNA expression of telomere-associated genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma." *Mol Med* **16**(11-12): 471-478.
- Penzo, M., V. Ludovini, et al. (2015). "Dyskerin and TERC expression may condition survival in lung cancer patients." *Oncotarget* **6**(25): 21755-21760.
- Perry, K. I. and S. J. MacDonald (2016). "The obese patient: a problem of larger consequence." *Bone Joint J* **98-B**(1 Suppl A): 3-5.

- Picco, V., I. Coste, et al. (2016). "ERK1/2/MAPK pathway-dependent regulation of the telomeric factor TRF2." *Oncotarget*.
- Pleava, R., D. Gaita, et al. (2016). "Obesity in association with Sleep Apnea Syndrome as predictor for coronary-vascular comorbidities." *Pneumologia* **65**(1): 14-18.
- Qiang, W., Q. Wu, et al. (2014). "Suppression of telomere-binding protein TPP1 resulted in telomere dysfunction and enhanced radiation sensitivity in telomerase-negative osteosarcoma cell line." *Biochem Biophys Res Commun* **445**(2): 363-368.
- Rajavel, M., T. Orban, et al. (2016). "Dynamic peptides of human TPP1 fulfill diverse functions in telomere maintenance." *Nucleic Acids Res.*
- Rao, X., J. Zhong, et al. (2014). "The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes." *Life Sci* **116**(2): 59-66.
- Ratner, D., M. P. Orning, et al. (2017). "Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation." *J Leukoc Biol* **101**(1): 165-181.
- Rausch, M. E., S. Weisberg, et al. (2008). "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration." *Int J Obes (Lond)* **32**(3): 451-463.
- Razavi, A., M. R. Baghshani, et al. (2013). "Obese subjects have significantly higher serum prooxidant/antioxidant balance values compared to normal-weight subjects." *Clin Lab* **59**(3-4): 257-261.
- Rode, L., B. G. Nordestgaard, et al. (2014). "Increased body mass index, elevated C-reactive protein, and short telomere length." *J Clin Endocrinol Metab* **99**(9): E1671-1675.
- Rodriguez-Hernandez, H., L. E. Simental-Mendia, et al. (2013). "Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation." *Int J Endocrinol* **2013**: 678159.
- Rowe, G. C., S. Raghuram, et al. (2014). "PGC-1alpha induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle." *Circ Res* **115**(5): 504-517.
- Rubtsova, M. P., D. P. Vasilkova, et al. (2012). "Telomere lengthening and other functions of telomerase." *Acta Naturae* **4**(2): 44-61.
- Savage, S. A. and B. P. Alter (2009). "Dyskeratosis congenita." *Hematol Oncol Clin North Am* **23**(2): 215-231.
- Savage, S. A., I. Dokal, et al. (2009). "Dyskeratosis congenita: the first NIH clinical research workshop." *Pediatr Blood Cancer* **53**(3): 520-523.
- Schmandt, R. E., D. A. Iglesias, et al. (2011). "Understanding obesity and endometrial cancer risk: opportunities for prevention." *Am J Obstet Gynecol* **205**(6): 518-525.
- Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." *Exp Cell Res* **237**(1): 7-13.
- Sfeir, A., S. Kabir, et al. (2010). "Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal." *Science* **327**(5973): 1657-1661.
- Shu, C. J., C. Benoist, et al. (2012). "The immune system's involvement in obesity-driven type 2 diabetes." *Semin Immunol* **24**(6): 436-442.
- Sica, A., M. Erreni, et al. (2015). "Macrophage polarization in pathology." *Cell Mol Life Sci* **72**(21): 4111-4126.
- Smogorzewska, A., B. van Steensel, et al. (2000). "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1659-1668.
- Sohrab, S. S., M. A. Kamal, et al. (2017). "Viral Infection and Obesity: current status and future prospective." *Curr Drug Metab.*
- Sone, H. and Y. Kagawa (2005). "Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice." *Diabetologia* **48**(1): 58-67.
- Stella, G. M., E. Balestro, et al. (2016). "Telomeropathies: an emerging spectrum of disorders with important implications for patients with interstitial lung disease." *Minerva Med* **107**(1 Suppl 1): 9-14.
- Stoker, R. The Immortality Pill--Available Now: How Nobel Prize Winning Anti-Aging Science on Telomeres, Telomerase and TA-65 Can Help You Live Longer and Healthier, Fight Aging, and Stay Young.



- Takai, H., E. Jenkinson, et al. (2016). "A POT1 mutation implicates defective telomere end fill-in and telomere truncations in Coats plus." *Genes Dev* **30**(7): 812-826.
- Tamary, H. and B. P. Alter (2007). "Current diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes." *Pediatr Hematol Oncol* **24**(2): 87-99.
- Teo, H., S. Ghosh, et al. (2010). "Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression." *Nat Cell Biol* **12**(8): 758-767.
- Townsley, D. M., B. Dumitriu, et al. (2014). "Bone marrow failure and the telomeropathies." *Blood* **124**(18): 2775-2783.
- Turner, K. J., V. Vasu, et al. (2014). "Telomere length analysis and preterm infant health: the importance of assay design in the search for novel biomarkers." *Biomark Med* **8**(4): 485-498.
- Tzanetakou IP, K. N., Benetos A, Mikhailidis DP, Perrea DN (2012). ""Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres." *Ageing Research Reviews* **11**: 220-229.
- van Steensel, B. and T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." *Nature* **385**(6618): 740-743.
- Walne, A. J., T. Vulliamy, et al. (2008). "TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes." *Blood* **112**(9): 3594-3600.
- Wang, B., I. S. Wood, et al. (2007). "Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes." *Pflugers Arch* **455**(3): 479-492.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808.
- Wu, C. Y., Y. C. Chou, et al. (2014). "Association of body mass index with all-cause and cardiovascular disease mortality in the elderly." *PLoS One* **9**(7): e102589.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." *Stem Cells* **25**(10): 2648-2659.
- Yeh, J. K. and C. Y. Wang (2016). "Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases." *Genes (Basel)* **7**(9).
- Zhang, J., G. Rane, et al. (2016). "Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation." *Ageing Res Rev* **25**: 55-69.
- Zhong, F. L., L. F. Batista, et al. (2012). "TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends." *Cell* **150**(3): 481-494.
- Zhou, J. G., Y. F. Qing, et al. (2011). "Changes in the expression of telomere maintenance genes might play a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *Lupus* **20**(8): 820-828.
- Zhou, Y., P. Zhou, et al. (2014). "Trend of telomerase activity change during human iPSC self-renewal and differentiation revealed by a quartz crystal microbalance based assay." *Sci Rep* **4**: 6978.
- Zimmermann, M., T. Kibe, et al. (2014). "TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling." *Genes Dev* **28**(22): 2477-2491.

## 10. ANEXOS

## 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.

**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

Continuação do Parecer: 640.817

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto adequado e não apresentando pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado

PORTO ALEGRE, 08 de Maio de 2014

---

**Assinador por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
**(Coordenador)**

**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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**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:** UNIAO 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:

Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505

Porto Alegre /RS - Brasil - CEP: 90619-900

Fone/Fax: (51) 3320.3345

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

**Bairro:** Partenon

**CEP:** 90.619-900

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3320-3345

**Fax:** (51)3320-3345

**E-mail:** cep@pucrs.br

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



Continuação do Parecer: 760.537

E-mail: cep@puhrs.br

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PORTO ALEGRE, 21 de Agosto de 2014

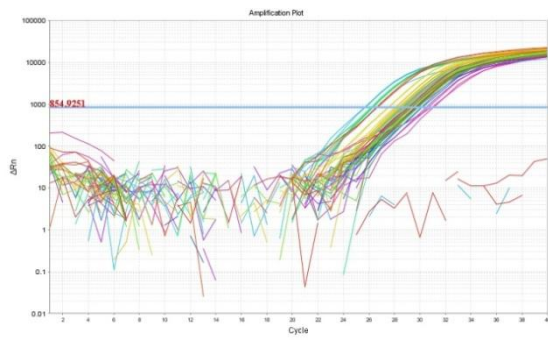
---

**Assinado por:**  
**Rodolfo Herberto Schneider**  
**(Coordenador)**

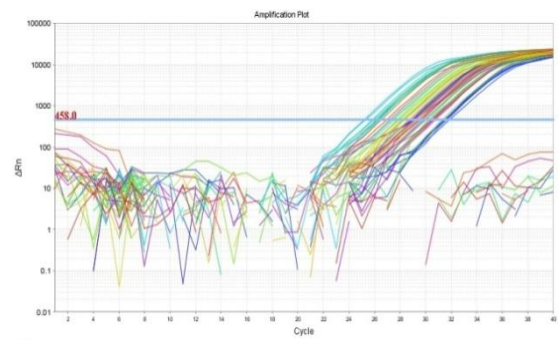
**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puhrs.br

## 11. Figuras Suplementares

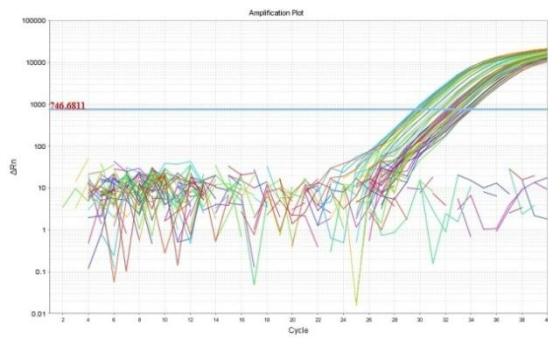
A)



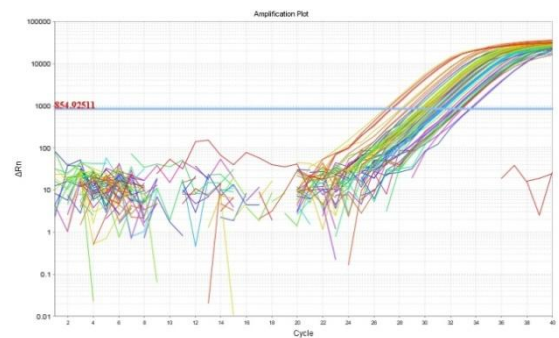
E)



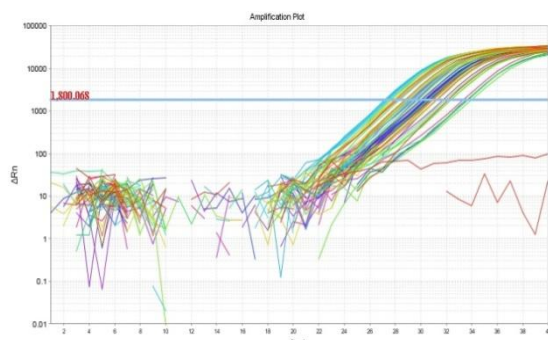
B)



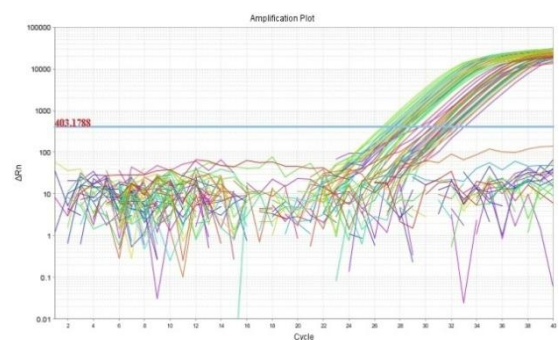
F)



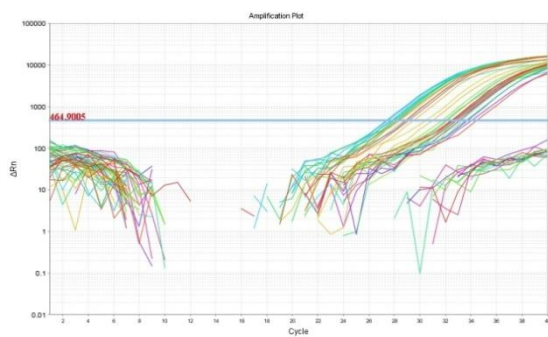
C)



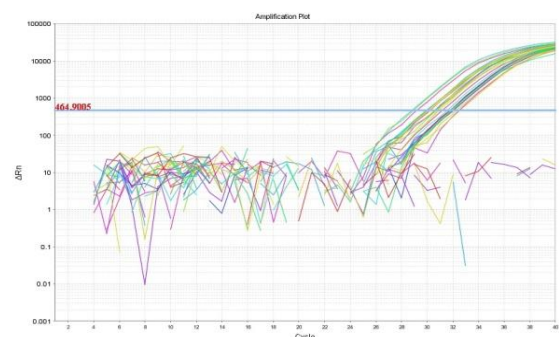
G)



D)

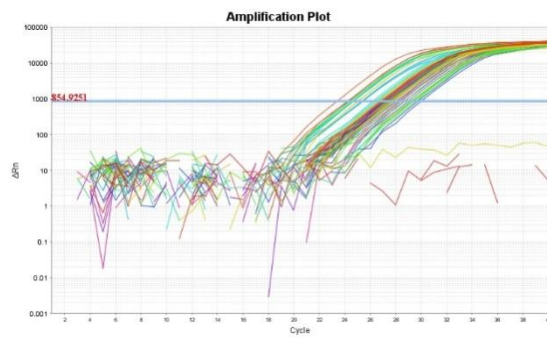


H)



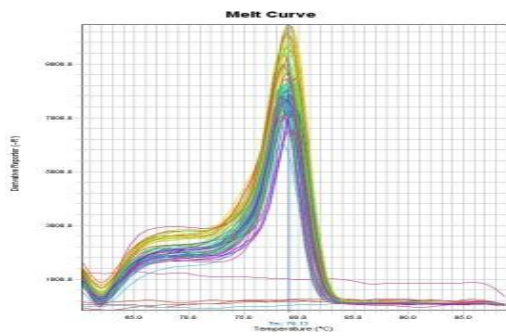


I)

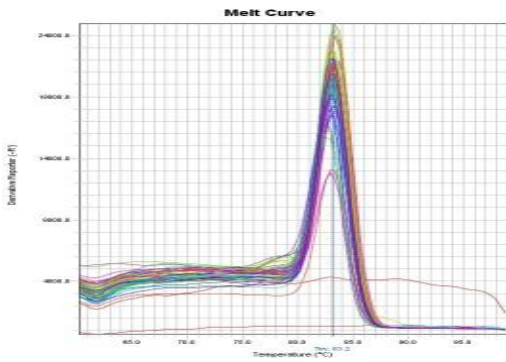


**Figura S1. Gráficos representativos das ampliações dos diferentes genes realizadas na qPCR utilizando o fluoróforo SYBRgreen como molécula de detecção.** A linha azul representa o limiar do ciclo ( $Ct = Cycle\ threshold$ ) utilizado para cada gene). A) TRF1, B) TRF2, C) TPP1, D) POT1, E) RAP1, F) DKC1, G) IL-1 $\beta$ , H) TNF- $\alpha$  e I) GBN2L1. (StepOne Plus versão 2.3, AppliedBiosystems).

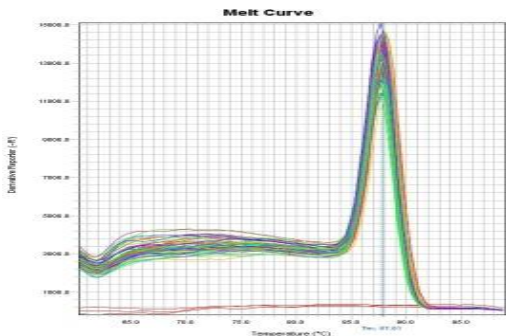
A)



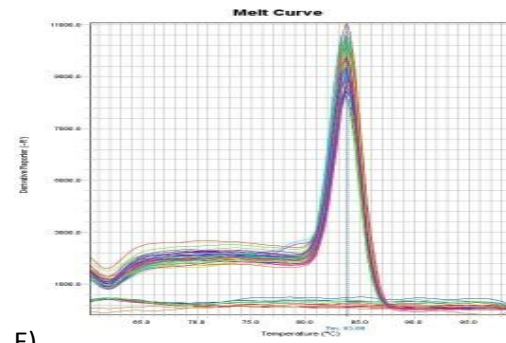
B)



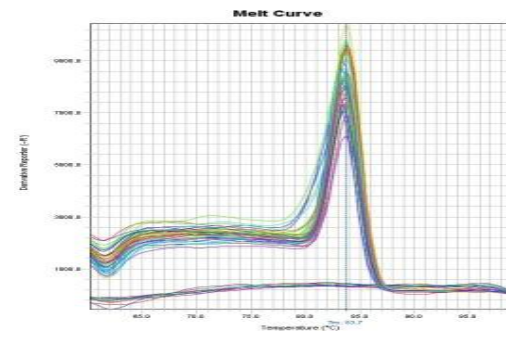
C)



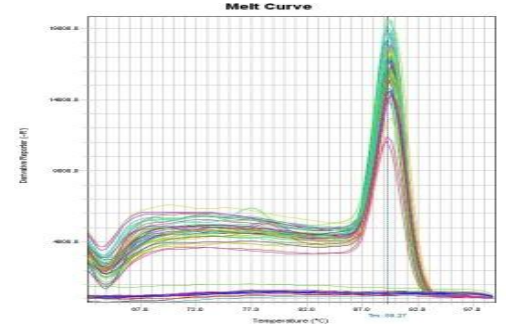
D)



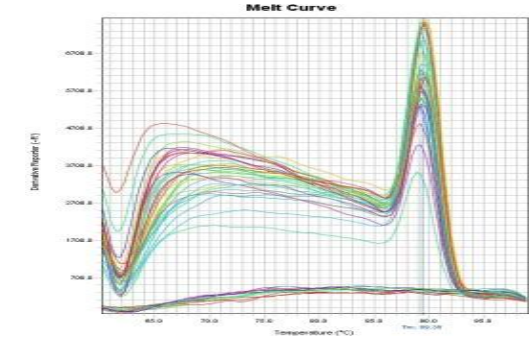
E)



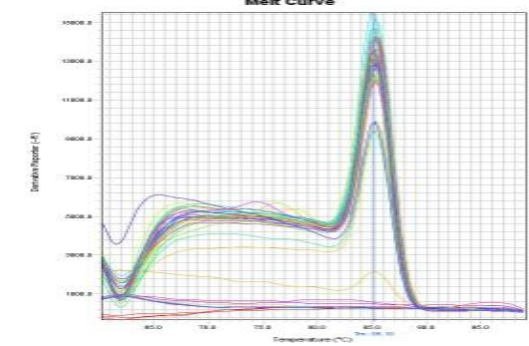
F)



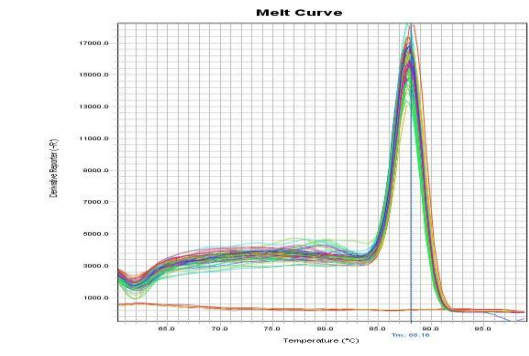
G)



H)

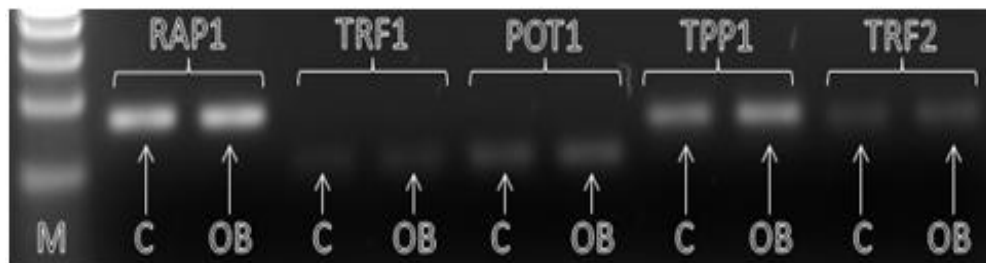


I)

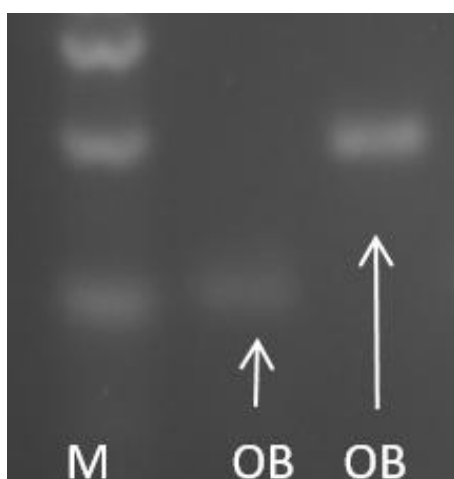


**Figura S2. Figuras representativas das curvas de dissociação de temperatura (curvas de *meltings*) de cada gene amplificado. A) TRF1, B) TRF2, C) TPP1, D) POT1, E) RAP1, F) DCK1, G) IL-1 $\beta$ , H) TNF- $\alpha$  e I) GBN2L1.**

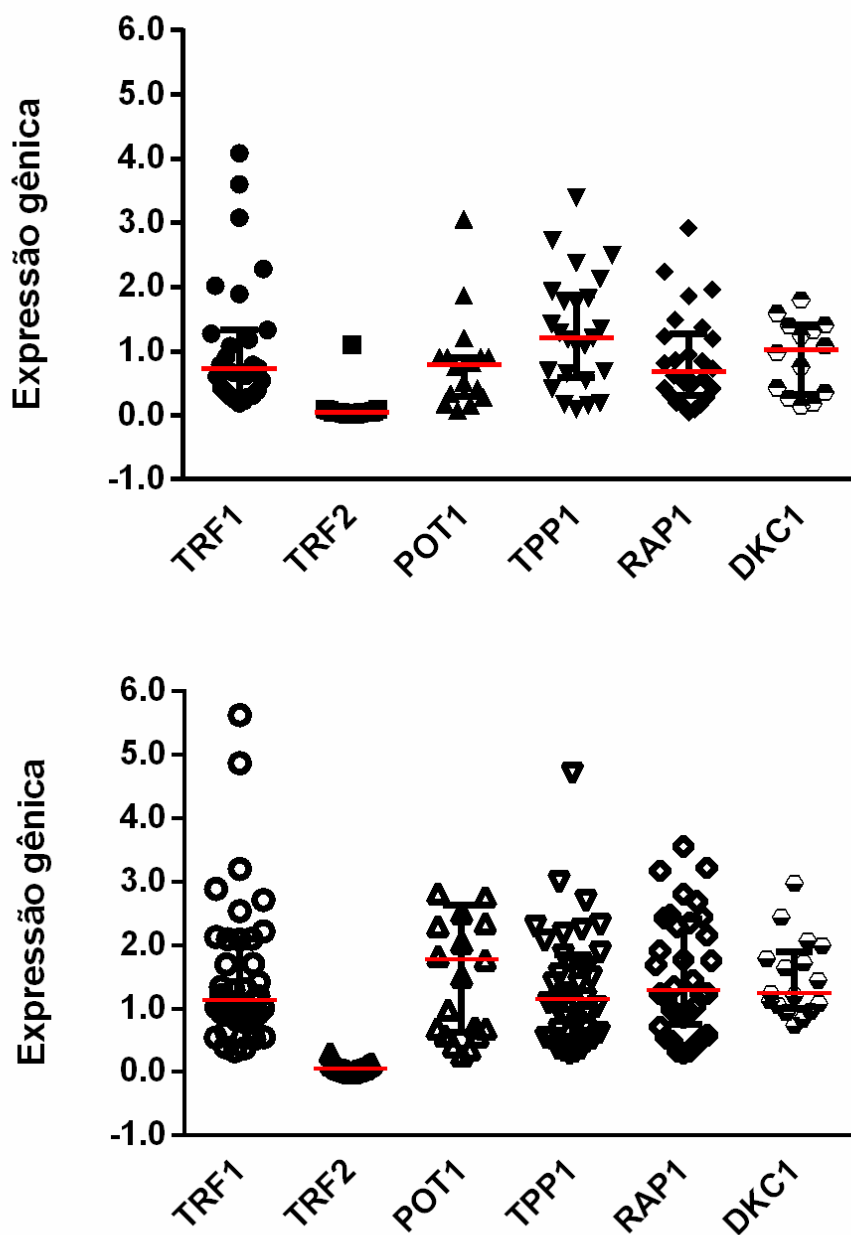
A)



B)



**Figura S3. Confirmação dos produtos de PCR.** Amostras representativas foram separadas em gel de agarose (3%) e coradas com SYBRsafe (Invitrogen) para confirmação de banda única do tamanho esperado, corroborando a especificidade observada nas curvas de dissociação de temperatura (curvas de melting). M: Marcador de peso molecular (100pb), C: Amostra de Controle, OB: Amostra de Obeso. A) Produto de amplificação de PCR de RAP1 (165 pb), TRF1 (116 pb), POT1 (102 pb), TPP1 (152 pb) e TRF2 155 pb. B) A) Produto de amplificação de PCR de DKC1 (106 pb) e IL-1 $\beta$  (199 pb).



**Figura S4. Comparação da expressão gênica dos genes analisados no grupo controle (painel superior) e no grupo portadores de obesidade (painel inferior). Os gráficos representam mediana (linhas horizontais vermelhas) e intervalo interquartil (25-75%) (linhas horizontais pretas) para cada um dos genes analisados.**