

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Taynná El Cury Silva

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DO  
COMPRIMENTO RELATIVO TELOMÉRICO NO *Caenorhabditis elegans***

Belo Horizonte

2016

Taynná El Cury Silva

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DO  
COMPRIMENTO RELATIVO TELOMÉRICO NO *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Professora Dra. Débora Marques de Miranda.

Coorientadora: Dra. Daniela Valadão Freitas Rosa.

Coorientador: Dr. Alexandre Guimarães de Almeida Barros.

Belo Horizonte

2016

S586p Silva, Taynná El Cury.  
Padronização da técnica de qPCR para quantificação do comprimento relativo telomérico no *Caenorhabditis elegans* [manuscrito]. / Taynná El Cury Silva. - - Belo Horizonte: 2016.  
64f.: il.  
Orientador (a): Débora Marques de Miranda.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Telômero. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Débora Marques de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM : QX 203

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por conceder essa oportunidade tão especial na minha vida, além da graça de conhecer pessoas fantásticas e que sentirei falta no dia-a-dia.

Em especial, agradeço infinitamente aos meus pais. Carlos, meu pai, que sempre incentivou todo meu trajeto acadêmico, que sempre nos fez colocar os estudos em primeiro lugar, trabalhando arduamente para que eu e meus irmãos tivéssemos as melhores perspectivas futuras. Minha mãe, Raquel, desde muito jovem dedicou sua vida aos filhos, para que pudéssemos ser acompanhados diariamente e nos fosse fornecido o carinho e atenção necessária. Ao meu querido amigo de infância e da vida, Pink, por todo o amor incondicional.

Agradeço muito ao Bruno, por acreditar no meu desempenho com todo carinho e companheirismo em várias etapas da minha vida, sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso profissional.

Agradeço a Professora Débora, por contribuir na minha formação, pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço minha coorientadora Dani, não só por ajudar a colocar um rumo no meu trabalho, mas pela amizade construída com o tempo, por todo ensino, paciência e dedicação.

Agradeço ao meu coorientador Alexandre, por sempre que possível dedicar seu tempo a minha orientação, contribuir para minha formação e ter me proporcionado dias divertidos!

Agradeço ao Maicon, o professor com a melhor didática de estatística que eu conheço (já falei isso para ele). Minha turma foi a primeira de bioestatística que ele deu aula. Nossos caminhos se distanciaram, mas quando eu menos esperava recebi um voto de confiança e crédito profissional. Sempre irei levar comigo essa gratidão.

Agradeço aos meus amigos sensacionais do laboratório: Cinthia, a Baiana de Ilhéus, foi uma grande companheira, para experimento, consultas médicas, conversa atoa e “academia”, além de organizar minha vida. Paty e António, por todas as gargalhadas que melhoraram com certeza os meus dias. Érika (Erikita), por tornar os meus dias mais reflexivos, cheios de nutella e alegres! Luiza (Luh) e Elizete, que me receberam muito bem e de maneira aconchegante no Lab. Aos meus dois filhotes:

Michelle (Mix) e Eduardo (Dudis), agradeço a oportunidade de ensinar e aprender. Agradeço também ao Kevin e ao Matheus, essa dupla dinâmica me ajudou sempre que precisei. A minha amiga a distância e mais recente mestre, Aurita, por compartilhar das mesmas angústias e das mesmas graças. E por último das minhas amigadas, agradeço a amiga mais descompensada que tenho, Naty, agradeço por participar da minha vida desde a época de faculdade e hoje participar e ver esse momento de mais uma etapa finalizada.

Agradeço ao Professor Magno, pelo acréscimo de ciência. Uma pessoa incrivelmente cheia de conhecimento e para mim uma figura exemplar de pesquisador.

Agradeço ao Jonas, por toda atenção e orientação para as dúvidas estatísticas.

Agradeço ao José Edson, da Embrapa, que sem me conhecer me deu o seu tempo, atenção e dedicação.

E agradeço a todos que eu não citei aqui, mas que fazem parte desta jornada e contribuíram de algum modo para o meu crescimento profissional e pessoal.

E mais uma fase de minha vida se finaliza, deixando uma importante experiência profissional e pessoal.

*“Nunca te rendas aos problemas, pois eles são testes para  
uma nova fase”.*  
*(Arlindo Castro)*

## RESUMO

O telômero exerce papel fundamental na capacidade replicativa celular e através de seu comprimento tem-se uma estimativa da vida média da célula. Evidências demonstram que influências ambientais, sociais, nutritivas e fisiopatológicas podem implicar na variação de tamanho telomérico. Assim esse estudo teve como objetivo a padronização da técnica de qPCR para quantificação do comprimento relativo telomérico no nematódeo *Caenorhabditis elegans*. O uso desse organismo como modelo já se mostrou viável para estudar telômeros. Estudos mostraram que o nematódeo possui um complexo telomérico semelhante aos mamíferos e suas principais características como curto ciclo de vida, fácil manipulação e versatilidade genética, o tornam um sistema ótimo para investigar mecanismos moleculares iniciais que possam interferir no tamanho telomérico. Estas características são, especialmente, válidas para desenvolvimento de pesquisas porvindouras mais direcionadas e embasadas em modelos vertebrados, objetivando-se uma efetiva aplicação clínica futura. Também foi levado em consideração o interesse em medir o comprimento dos telômeros no *C. elegans* utilizando um método menos operoso, mais acessível e rápido, ultrapassando os limites impostos por técnicas até hoje padronizadas para o nematódeo. Foram utilizadas as seguintes cepas: N2 (selvagem), CB3192 (selvagem), sabidamente com telômero maior, e YA1059, previamente descrita na literatura com telômero menor. Os nossos resultados demonstraram coeficientes lineares para cada gene com valores próximos a 1 (Telômero –  $R^2 = 0,95$  / C44B7.8 -  $R^2 = 0,91$  / T09F3.3 -  $R^2 = 0,91$  / F25B4.6 -  $R^2 = 0,93$ ) e diferenças significativas entre cepas com tamanhos de telômeros distintos ( $p < 0,0001$  para CB3192 > N2 e CB3192 > YA1059;  $p = 0,0069$  para N2 > YA1059). Os resultados encontrados confirmam a capacidade da técnica em detectar diferentes tamanhos de telômeros perante diferentes cepas em *C. elegans*. Contudo, a validação da técnica qPCR com o método padrão ouro ainda se faz necessária.

**Palavras-chave:** *Caenorhabditis elegans*, telômero, qPCR, padronização.

## ABSTRACT

Telomeres have a fundamental role in cellular replication and through their length it is possible to estimate cellular life span mean. Evidence has shown that factors such as environmental, social, nutritional and physiopathological may be implicated in telomere length variation. It has been demonstrated that accelerated telomere shortening may be related to the early onset of several healthcare problems related to aging. Once determined the importance of telomere length analyses, this study aimed to standardize a qPCR based technique to quantify relative telomere length in *Caenorhabditis elegans*. The use of this model has already shown to be viable in telomere-based studies. Studies show that due to its main characteristics, such as, short life cycle, easy manipulation, genetic versatility and telomere complex similar to mammals, this model may be considered ideal to investigate initial molecular mechanisms that may interfere in telomere length. Such characteristics are, especially, valid for the developing of upcoming researches based on and directed to vertebrate models, aiming at an effective future clinical application. It was also taken in consideration the interest in measuring *C. elegans* telomere length in a less laborer but more accessible and faster manner, overcoming the limits of less efficient techniques standardized for this model. Strains N2 (Wild Type), CB3192 (Wild type), with a known longer telomere length, YA1059 strain, which has been previously shown to have a shorter telomere. Our results demonstrated linear coefficients for each gene with values proximate to 1 (Telomere –  $R^2 = 0,95$  / C44B7.8 -  $R^2 = 0,91$  / T09F3.3 -  $R^2 = 0,91$  / F25B4.6 -  $R^2 = 0,93$ ) and significant differences between strains with distinct telomere size ( $p < 0,0001$  for CB3192 > N2 e CB3192 > YA1059;  $p = 0,0069$  for N2 > YA1059). Results found, confirm the efficiency of the technique in relative telomere length measuring in *C. elegans* and its sensibility towards different strains. However the need of validating the qPCR technique through a gold standard method is still necessary.

**Key-Words:** *Caenorhabditis elegans*, Telomere, qPCR, Standardizing.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Cromossomo eucarioto e localização dos telômeros .....  | 18 |
| Figura 2. Complexo telomérico.....  | 20 |
| Figura 3. Ilustração da diminuição dos telômeros após proliferação celular .....  | 22 |
| Figura 4. Problema de replicação final dos cromossomos .....  | 23 |
| Figura 5. Encurtamento crítico dos telômeros .....  | 24 |
| Figura 6. Complexo telômero / telomerase .....  | 25 |
| Figura 7. Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> .....  | 27 |
| Figura 8. O nematódeo <i>C. elegans</i> .....   | 28 |
| Figura 9. Esquema das proteínas teloméricas do nematódeo <i>C. elegans</i> . .....                                      | 30 |
| Figura 10. Adaptação do desenho dos iniciadores teloméricos para a técnica de qPCR no nematódeo <i>C. elegans</i> ..... | 43 |
| Figura 11. Coeficiente de regressão linear após estabelecimento das curvas padrão para todos os genes.....              | 47 |
| Figura 12. Análise das curvas de dissociação das amostras de referência e dos controles negativos .....                 | 48 |
| Figura 13. Estabilidade da técnica de qPCR.....   | 49 |
| Figura 14. Avaliação do comprimento relativo telomérico entre cepas com tamanho de telômeros distintos .....            | 50 |
| Figura 15. Especificidade dos iniciadores teloméricos.....  | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Iniciadores teloméricos específicos utilizados na reação de qPCR no <i>C. elegans</i> ..... | 40 |
| <b>Tabela 2.</b> Sequência hexamérica dos Telômeros.....   | 46 |
| <b>Tabela 3.</b> Caracterização das cepas do nematódeo <i>C. elegans</i> quanto ao tamanho telomérico.....   | 50 |

## LISTA DE QUADRO

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1.</b> Proteínas que interagem com os telômeros ..... | 21 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABI** – Applied Biosystems

**ALT** – Alongamento alternativo do telômeros

**CT** – Ciclo limiar (do inglês, *Cycle Threshold*)

**CeOB1** – *C. elegans* Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding 1

**CeOB2** – *C. elegans* Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding 2

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DC** – Disqueratose congênita

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeos

**FISH** – Fluorescência de hibridização *in situ*

**gDNA** – DNA genômico

**hTERC** – Componente carreador de RNA humano

**hTERT** – Componente efetor da transcriptase reversa humana

**hPOT-1** – Proteção dos telômeros 1 humano

**Kb** – Kilobase

**MRT-1** – Linhagem mortal 1 (Mortal germline 1)

**MMqPCR** – qPCR multiplex monocromático

**NGM** – Meio de crescimento de nematóides

**NTC** – Controle sem DNA

**NPC** – Controle sem iniciadores

**PNA** – Peptídeoácidonucleico

**POT-1** – Proteção dos telômeros 1 (do inglês, *Protection of Telomere 1*)

**POT-2** – Proteção dos telômeros 2

**POT-3** – Proteção dos telômeros 3

**Q-FISH** – Fluorescência quantitativa de hibridização *in situ*

**qPCR** – Reação de cadeia da polimerase quantitativa (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*)

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RAP-1** – Repressor/ativador de proteínas

**SB** – Southern Blotting

**STELA** – Análise do comprimento único do alongamento dos telômeros (do inglês, *Single telomere length analysis*)

**TRF-1** – Fator ligante da repetição dos telômeros 1 (do inglês, *Telomere repeat binding factors 1*)

**TRF-2** – Fator ligante da repetição dos telômeros 2 (do inglês, *Telomere repeat binding factors 2*)

**TIN-2** – TRF-1 e TRF-2 fator integrador nuclear 2 (do inglês, *TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2*)

**TPP1** – TINT1, PTOP, PIP1 Proteína organizadora (do inglês, *TINT1, PTOP, PIP1 Organizing protein*)

**TERC** – Componente carreador de RNA

**TERT** – Componente efetor da transcriptase reversa

**TRF** – Fragmentos de restrição terminal

**Taq** – *Thermus aquaticus*

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 16 |
| 1.1. Telômeros .....  | 17 |
| 1.1.1. Histórico .....  | 17 |
| 1.1.2. Estrutura e função dos telômeros .....   | 18 |
| 1.1.3. Problema de replicação final .....   | 21 |
| 1.1.4. Telomerase .....   | 24 |
| 1.2.1. Estrutura telomérica no nematódeo <i>C. elegans</i> .....                                  | 28 |
| 1.3. Principais métodos e a importância da determinação do comprimento telomérico .....           | 30 |
| 1.3.1. Southern Blotting .....  | 31 |
| 1.3.2. Fluorescência quantitativa de hibridização in situ Q-FISH e Flow-FISH ...                  | 31 |
| 1.3.3. PCR em tempo real .....  | 32 |
| 1.3.4. Análise do comprimento único de telômeros (STELA) .....                                    | 34 |
| 1.3.5. Principais métodos de determinação do comprimento dos telômeros no <i>C. elegans</i> ..... | 34 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 36 |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 37 |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 37 |
| 3. MÉTODOS .....  | 38 |
| 3.1. Cepas .....  | 39 |
| 3.2. Manutenção e cultura .....   | 39 |
| 3.3. Extração de DNA genômico .....   | 40 |
| 3.4. Análise do comprimento dos telômeros .....   | 40 |
| 3.5. Reação para a PCR quantitativa .....   | 42 |
| 3.6. Testes estatísticos .....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 4. RESULTADOS .....   | 45 |
| 4.1. Desenho dos iniciadores teloméricos.....                                 | 46 |
| 4.2. Padronização da técnica de qPCR .....                                    | 46 |
| 4.3. Validação da quantificação telomérica por qPCR em diferentes cepas ..... | 49 |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 52 |
| 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....  | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS.....   | 59 |
| 8. ANEXOS .....   | 66 |

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Telômeros

### 1.1.1. Histórico

Em 1912, o cirurgião francês e biólogo Alexis Carrel estabeleceu uma cultura de células embrionárias de fibroblastos cardíacos de galinha, e as manteve por mais de 34 anos, sugerindo que as mesmas eram imortais. Esta demonstração levou à aceitação de que as células de vertebrados eram imortais quando *in vitro* e que o envelhecimento era um fenômeno multicelular como um todo (WITKOWSKI, 1985).

Em 1929, o geneticista norte-americano Hermann J. Müller observou que o DNA de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* expostas aos raios X causava danos aos cromossomos seguido de fusões, porém as extremidades não sofriam alterações, possuindo alguma proteção, denominada de telômero (do grego *telos*, fim, e *meros*, parte) (MULLER; ALTENBURG, 1929). Alguns anos depois, Bárbara McClintock descreveu em seu estudo da genética do milho, um fenômeno semelhante, sugerindo também uma estrutura protetora no fim dos cromossomos (MCCLINTOCK, 1939).

Apenas em 1961, houve o questionamento sobre o conceito de imortalidade celular. Hayflick e Moorehead publicaram um trabalho mostrando que as culturas de fibroblastos de pele humana tiveram um número de replicações finitas e alcançaram a senescência, contradizendo os experimentos de Carrel, que não foram reprodutíveis (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961).

Em 1972, James D. Watson identificou o problema da replicação final, que consiste na incapacidade das células de replicar completamente as extremidades do DNA linear, devido a ausência do grupo hidroxila para a ligação da DNA polimerase e ainda postulou a existência de um mecanismo de proteção para evitar o encurtamento cromossômico (WATSON, 1972). No mesmo ano, o cientista russo Alexey Olivnikov propôs que o encurtamento telomérico, estaria relacionado com o problema de replicação final descrito por Watson e que isso poderia desencadear a senescência celular descrita por Hayflick (OLOVNIKOV, 1972). Este modelo proposto por Olivnikov é considerado até os dias atuais.

Os pesquisadores ainda acreditavam que, de algum modo, as células mantinham o comprimento dos telômeros durante a replicação do DNA. No início de

1980, a pesquisadora Elizabeth Blackburn fez uma descoberta que atualizou conhecimentos na biologia celular. Em seus trabalhos com levedura, Blackburn e colaboradores estabeleceram que os telômeros são estruturas hexaméricas em repetição de DNA que protegem as extremidades dos cromossomos e que possuem uma maquinaria enzimática para manutenção do comprimento do telômero. Em 1987, Elizabeth Blackburn e sua aluna Carol W. Greider descobriram a enzima responsável pela replicação dos telômeros, a telomerase, no ciliado *Tetrahymena* (GREIDER; BLACKBURN, 1987). Blackburn e Jack Szostak foram ganhadores do Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina (2009) por essa descoberta.

### 1.1.2. Estrutura e função dos telômeros

Os telômeros são complexos nucleoprotéicos, compostos por estruturas especializadas de DNA. Estão localizados em ambas as extremidades de cada cromossomo linear, que garante a integridade genômica, protege as extremidades cromossômicas de recombinação e de fusões. Isso assegura que não sejam reconhecidas como pontos de danos no DNA (STEWART *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2013). A figura 1 ilustra a localização dos telômeros em um cromossomo eucarioto.

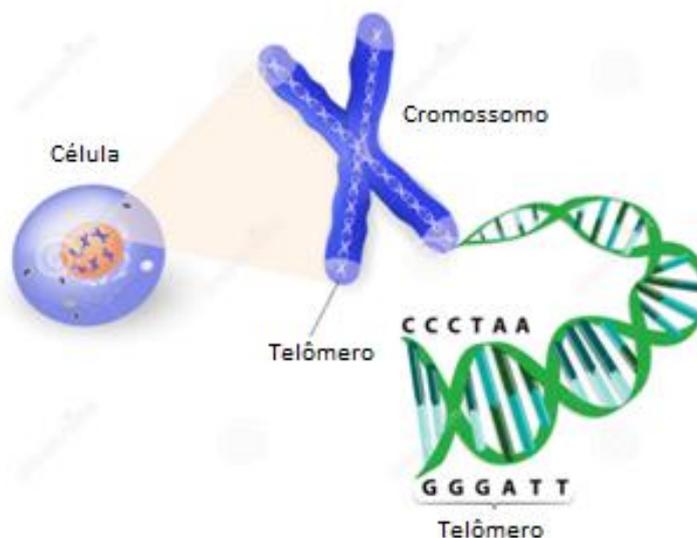


Figura 1. Cromossomo eucarioto e localização dos telômeros. Adaptada de (DREAMSTIME, 2016).

Na maior parte dos vertebrados, os telômeros consistem em DNA de cadeia dupla. Essa estrutura é composta por repetição hexaméricas e terminam com sua

extremidade 3' em cadeia simples, com uma saliência de 150 a 250 nucleotídeos de comprimento rica em guanina (G), e sua extremidade 5' mais curta e em cadeia dupla rica em citosina (C) (OGANESIAN; KARLSEDER, 2011; SHAMMAS, 2011).

O comprimento e a sequência de repetições variam entre espécies, mas apresentam alta conservação em eucariotos. Algumas leveduras possuem telômeros menores e mais heterogêneos, com menos de 100 pares de bases. Os mamíferos possuem repetição de seis nucleotídeos (TTAGGG)<sub>n</sub> com número de repetição (n) variável. Em humanos, o tamanho varia entre 10-15 quilobases (Kb) (O'CONNOR, 2008; NANDAKUMAR; CECH, 2013)

Análise por microscopia eletrônica revelou que a proteção conferida pelos telômeros depende da manutenção de sua estrutura, formada pelo DNA telomérico em conjunto com proteínas de ligação (complexo das shelterinas) que se ligam à saliência da porção 3' de fita simples e levam à inserção desta extremidade na cadeia 5' de fita dupla telomérica, formando um arranjo, denominado volta-T (Figura 2). Este arranjo oculta a extremidade do telômero e bloqueia a ligação de fatores de reparo. Na ausência de telômeros funcionais, a extremidade livre é instável e está sujeita a processos celulares reparadores de quebra que sinalizam como pontos de verificação de danos e podem ser degradados por nucleases (GREIDER, 1999; LANGE, 2004; STEWART *et al.*, 2012).

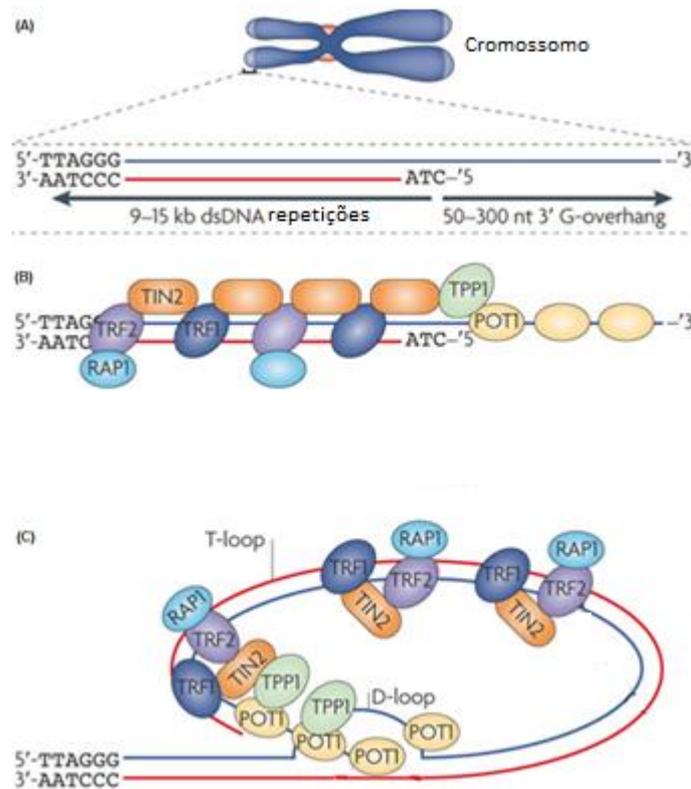


Figura 2. Complexo telomérico. (A) Saliência da extremidade 3' do cromossomo. (B) Proteínas do complexo das shelterinas. (C) T-loop e complexo das shelterinas. Adaptado de (O'SULLIVAN; KARLSEDER, 2010).

Em humanos, o complexo das shelterinas é composto pelas proteínas descritas no Quadro 1. (LANGE, 2004; STEWART *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2013). Estudos mostraram que a inibição ou a redução dos níveis das shelterinas podem promover o alongamento dos telômeros, porém deixando-os mais expostos a danos. Além disso, as proteínas de ligação telomérica exercem ação de vias de reparo a danos no DNA e são vitais para manutenção do telômero (LANGE, 2004; LU *et al.*, 2013; O'SULLIVAN; KARLSEDER, 2010; STEWART *et al.*, 2012).

Quadro 1. Proteínas que interagem com os telômeros

| Abreviação | Proteínas   | Função   |
|------------|---|--|
| TRF-1      | <i>Telomere repeat binding factors 1</i>            | São importantes para a regulação do comprimento telomérico. TRF1 pode inibir o alongamento dos telômeros pela telomerase, enquanto TRF2 tem como principal função impedir o reconhecimento da porção final dos cromossomos como regiões de quebras, além de promover a montagem do T-loop. |
| TRF-2      | <i>Telomere repeat binding factors 2</i>            |  |
| RAP-1      | <i>Repressor/ activator protein 1</i>               | RAP1 está associada com a estabilização de TRF2, ainda não sendo muito bem esclarecida.  |
| POT-1      | <i>Protection of telomeres 1</i>                    | POT1 previne a degradação do DNA telomérico de cadeia simples por nucleases, através da inserção da extremidade 3' à fita dupla, trabalhos sugerem que o aumento de POT1 pode bloquear a acessibilidade da telomerase. TPP1 é associada a POT1 e reforça a sua atividade.                  |
| TPP1       | TINT1, PTOP, PIP1<br><i>Organizing protein</i>      |  |
| TIN-2      | <i>TRF1 and TRF-2-interacting nuclear protein 2</i> | Não se liga diretamente ao DNA telomérico, interage com TRF-1, TRF-2 e TPP1, estabilizando estes complexos.  |

### 1.1.3. Problema de replicação final

O telômero exerce papel crítico na capacidade replicativa celular, determinando a vida média da célula e sua senescência. Estudos sugerem que, em células somáticas humanas, os telômeros encurtam cerca de 100 pares de base a cada divisão celular (LEVY *et al.*, 1992; RAICES *et al.*, 2008; BLACKBURN; EPEL; LIN, 2015). Este fato ocorre devido às propriedades da enzima DNA polimerase que geram o denominado "problema de replicação final". Desse modo, os telômeros são encurtados e podem chegar a um comprimento crítico em que não são mais capazes de promover a integridade cromossômica (Figura 3) (DAHSE; FIEDLER; ERNST, 1997; DANCIS; HOLMQUIST, 1979).

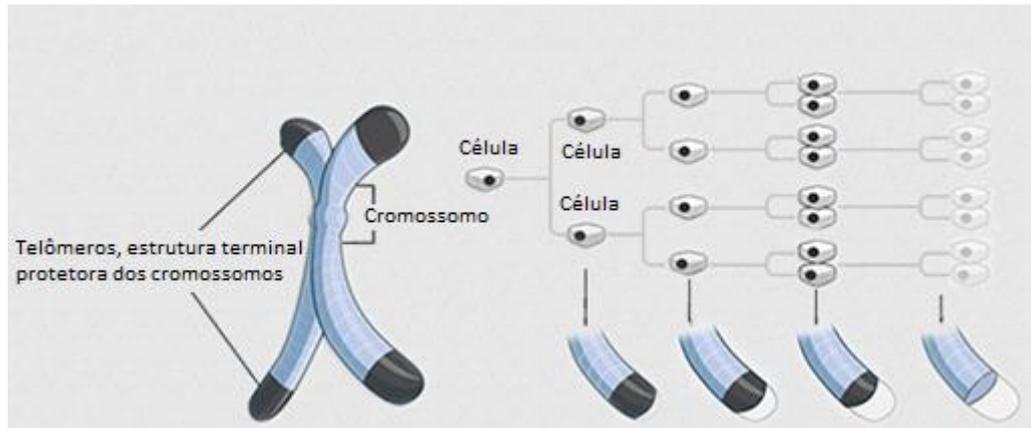


Figura 3. Ilustração da diminuição dos telômeros após proliferação celular. Adaptado de (T.A. CIENCES, 2016).

O processo de duplicação do DNA ocorre de forma semiconservativa, a partir de uma fita molde antiparalela de DNA. A fita se estende no sentido 5' para 3' em direção a abertura da forquilha de replicação, enquanto a fita complementar se estende no mesmo sentido, porém em direção oposta a abertura da forquilha, resultando em uma replicação mais lenta e descontínua. Para que a fita seja totalmente replicada, a DNA polimerase exige a inserção de vários iniciadores de RNA, que possuem grupos hidroxilas livres na extremidade 3' para síntese da nova fita. Posteriormente, os iniciadores são removidos e substituídos por sequências de DNA, contudo, o fragmento da extremidade 3' da fita molde não pode ser replicado, pois a remoção do iniciador de RNA faz com que a DNA polimerase não tenha sítio de ligação para a síntese de DNA nesse trecho. Consequentemente, os telômeros não são completamente sintetizados e tornam-se criticamente mais curtos a cada divisão celular, funcionando como “relógio mitótico” (LEVY *et al.*, 1992; LANGE, 2009). A figura 4 esboça esse problema.

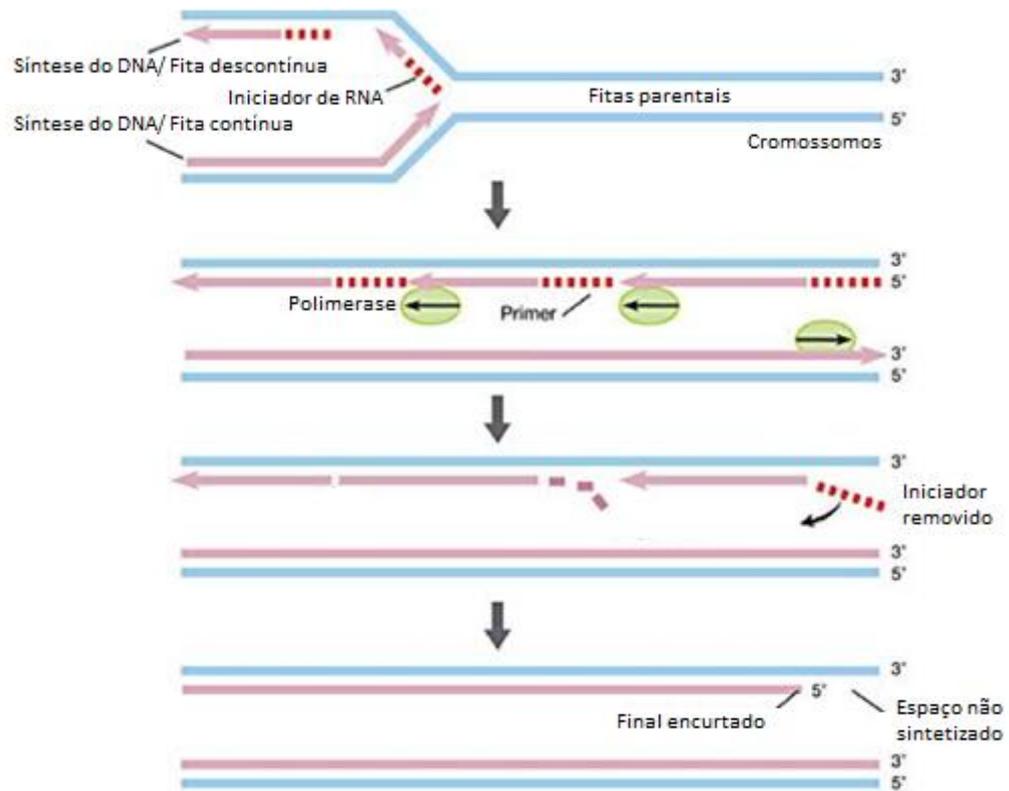


Figura 4. Problema de replicação final dos cromossomos. Adaptado de (BLACKBURN; GREIDER; SZOSTAK, 2009).

Quando o encurtamento dos telômeros atinge um comprimento limite, a volta-T se desfaz, então as células com vias de sinalização funcionais, levam a ativação das vias responsáveis pela interrupção do crescimento, como p53, que desencadeia a senescência ou apoptose, limitando assim a proliferação das células (DAHSE; FIEDLER; ERNST, 1997; HAYASHI *et al.*, 2015). No entanto, se essa via de resposta aos danos no DNA estiver inativa, os telômeros não conseguem mais manter o seu papel protetor e a instabilidade cromossômica é desencadeada. Os danos no DNA são mantidos ao longo dos ciclos com a proliferação celular, até que uma segunda intervenção seja alcançada, denominada de “crise” ou estágio de mortalidade 2, resultando em morte celular (Figura 5) (HEMANN *et al.*, 2001; HAYASHI *et al.*, 2015). Algumas células podem se esquivar através da manutenção dos telômeros via telomerase ou pelo alongamento alternativo dos telômeros (ALT) e acumularem alterações genômicas que contribuem para um potencial tumor (COUNTER, 1996; LONDOÑO-VALLEJO, 2008; ARMANIOS, 2009).

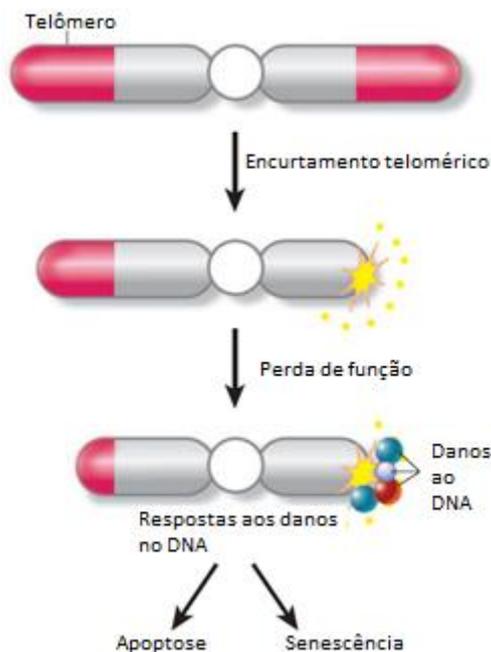


Figura 5. Encurtamento crítico dos telômeros Adaptado de (ARMANIOS, 2009).

#### 1.1.4. Telomerase

A telomerase é uma ribonucleoproteína carreadora de RNA, efetora da transcriptase reversa. Essa enzima é responsável pela manutenção dos telômeros e é constituída por duas principais unidades: componente carreador de RNA (TERC) e componente efetor da transcriptase reversa (TERT). Desde sua descoberta, estudos são conduzidos com o intuito de entender a relação da telomerase com outros mecanismos e sua associação a doenças (CONG; WRIGHT; SHAY, 2002; NANDAKUMAR; CECH, 2013).

Em 1997, Belair demonstrou que existe grande variação na expressão desta enzima entre os tecidos. Sua expressão se correlaciona positivamente com a necessidade de proliferação de cada célula, tornando-se elevada em 90% dos tumores e encontrando-se ativa nas células germinativas e progenitoras (BELAIR *et al.*, 1998; CONG; WRIGHT; SHAY, 2002).

Uma vez que a célula entra em proliferação, o problema de replicação final ocorre. No entanto, o encurtamento progressivo dos telômeros pode ser impedido a partir do recrutamento da telomerase. A telomerase ativada, interage com a extremidade 3' da fita de DNA e através do uso de sua fita molde de RNA (TERC), a

enzima efetora (TERT) adiciona repetições teloméricas e alonga essa extremidade (Figura 6) (SANDIN; RHODES, 2014).

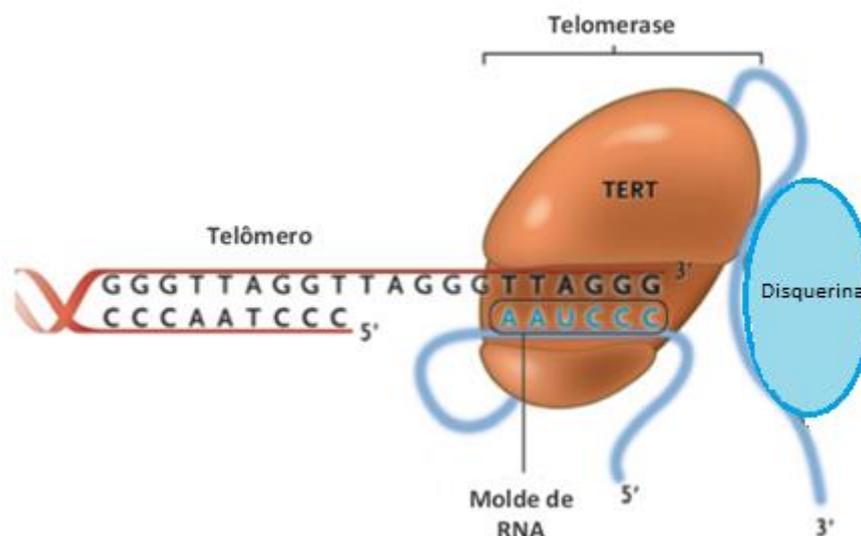


Figura 6. Complexo telômero / telomerase. Adaptado de (CALADO; YOUNG, 2012).

Estudos mostraram a correlação da telomerase com muitas doenças, a disqueratose congênita (DC) é um exemplo direto desta associação. DC é uma doença degenerativa, que afeta principalmente a medula óssea e outros tecidos com altas taxas de replicação celular, resultante da presença de mutações e perda de estabilidade da telomerase. Duas formas da doença foram relatadas nos últimos anos. A primeira resultante de modificações autossômicas dominante do gene *hTERC* e *hTERT*, e a segunda forma proveniente de mutações recessivas no gene *hTERC*, ambas resultando na perda progressiva de regiões teloméricas (TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2015).

A regulação da telomerase provém de diversos fatores, incluindo pré e pós-transcricional da unidade TERT. Essa manutenção, ocorre de forma sincronizada e conservada. Em humanos, a regulação transcricional de *TERT* é um fator limitante para o alongamento telomérico. A expressão da *hTERT* é baixa ou até mesmo nula em grande parte das células somáticas, porém é altamente expressa em células embrionárias, devido a elevada necessidade de proliferação celular (CIFUENTES-ROJAS; SHIPPEN, 2012).

## 1.2. *Caenorhabditis elegans*

Em 1974, Sydney Brenner descreveu o nematódeo *C. elegans* em seu artigo “The genetics of *Caenorhabditis elegans*” como modelo genético para melhor elucidação da biologia do desenvolvimento e neurobiologia, e ganhou o Nobel de Fisiologia e Medicina de 2002. Desde sua publicação, o nematódeo tem sido amplamente usado como organismo modelo para os mais diversos tipos de pesquisa (TISSENBAUM, 2015), incluindo envelhecimento e biologia do telômeros.

*C. elegans* é um nematódeo de vida livre, de aproximadamente 1 mm de comprimento, que habita a porção úmida do solo ou matéria vegetal em decomposição, onde se alimenta de bactérias e fungos. Em laboratório, esse organismo é facilmente cultivado, estabelecido em diferentes temperaturas, variando de 12 ° a 25 °C e mantido em placas de petri com meio de cultura NGM (*Nematode Growth Media*) contendo bactéria *Escherichia coli* como fonte de alimento. Quando o alimento é esgotado, o desenvolvimento das larvas jovens é interrompido e o animal entra em uma fase conhecida como *dauer*, que são formas resistentes que sobrevivem sem comida por meses e podem ser restauradas a partir de sua transferência para uma nova placa de cultivo com alimento. Uma das grandes vantagens para sua utilização em estudos científicos deve-se ao baixo custo de manutenção quando comparado com camundongos ou outros modelos (BRENNER, 1974; STIERNAGLE, 1999).

O *C. elegans* é um modelo simples, multicelular, com aproximadamente 1000 células somáticas, que constituem quatro quadrantes musculares rodeados por epiderme e cutícula com o intestino e gônadas alojados dentro da cavidade pseudocelômica e o cordão nervoso dorsal e ventral ao longo do corpo do nematódeo (YOCHER, 2006; WORMATLAS, 2016). Seu uso crescente como modelo experimental se deve a várias características. O *C. elegans* é um organismo diploide com aproximadamente 20.444 genes em cinco cromossomos autossômicos (I, II, III, IV e V) e um par de cromossomos X, tem seu desenvolvimento somático estereotipado e seu genoma sequenciado. Possui um ciclo de vida curto (3 dias) e se desenvolve através de quatro estágios larvais (L1-L4) até adulto grávido (Figura 7) (BRENNER, 1974; WICKY *et al.*, 1996; RAICES *et al.*, 2005; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

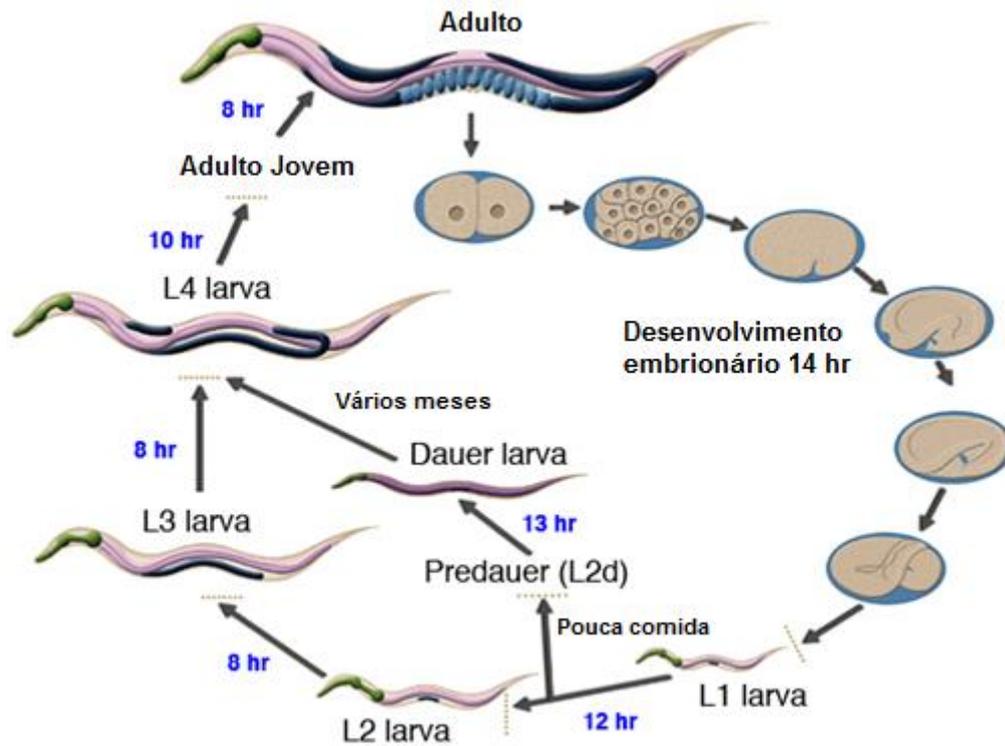


Figura 7. Ciclo de vida do *C. elegans*. Adaptado do site (WORMATLAS, 2016)

Sua capacidade reprodutiva é alta e são encontrados como hermafroditas (XX) e machos (X0) (0,01 %) (Figura 8). Os hermafroditas se autofertilizam, o que permite a geração de descendência idêntica em caso de homozigose. A existência de machos permite os cruzamentos e manipulações genéticas. Além disso, o nematódeo pode ser examinado vivo em nível celular através de microscopia, por apresentar transparência durante todo o seu ciclo de vida (BRENNER, 1974; WICKY *et al.*, 1996; RAICES *et al.*, 2005; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

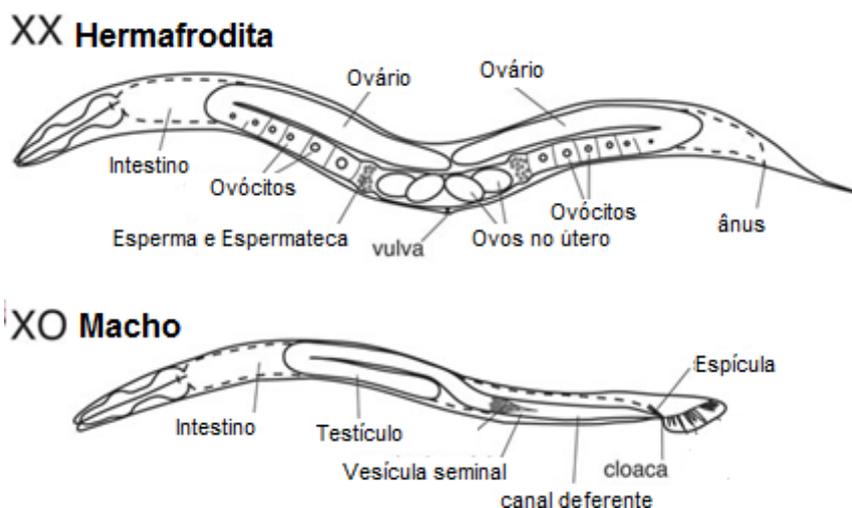


Figura 8. O nematódeo *C. elegans*. Adaptada do site (ZARKOWER, 2006).

*C. elegans* é um modelo importante para vários estudos. Sua semelhança com processos celulares e moleculares presentes em mamíferos e seu grupo de genes ortólogos aos humanos, ajuda na elucidação de percursos e processos relevantes para a biologia e doenças humanas. Embora ainda seja um modelo que proporcione esclarecimento sobre muitos mecanismos moleculares, deve-se lembrar que esse modelo invertebrado apresenta grande distância evolutiva. Entretanto, os organismos mais simples são habitualmente utilizados para pesquisas iniciais, a fim de fornecer respostas imediatas em nível molecular e definir novos pontos de estudos e intervenções. A vantagem do *C. elegans* perante modelos *in vitro* ou modelos celulares é que o nematódeo permite o estudo funcional no contexto de um organismo completo e comportamental, em vez de interação isolada (KALETTA; HENGARTNER, 2006; SHAYE; GREENWALD, 2011).

### 1.2.1. Estrutura telomérica no nematódeo *C. elegans*

Estudos já mostraram a existência de estruturas teloméricas no terminal dos cromossomos do *C. elegans*, consistindo em repetições de sequência TTAGGC. Os telômeros do nematódeo variam de 2-9 kb e são suficientes para estabilidade do genoma, assim como os telômeros em mamíferos (WICKY *et al.*, 1996; RAICES *et al.*, 2008).

Em 2008, Raices e colaboradores a fim de estabelecer a estrutura telomérica do *C. elegans*, descobriram que eles não só contêm saliências 3' ricas em guanina, como também possuem saliências 5' ricas em citosina. Esta observação gerou, mais tarde, uma nova análise da estrutura telomérica em mamíferos, demonstrando a presença de saliências de fita simples, ricas em citosina nos terminais dos cromossomos humanos e de camundongos (OGANESIAN; KARLSEDER, 2011).

A organização espacial dos telômeros no nematódeo também é caracterizada pela presença da volta – T, ligada a proteínas com domínios OB-fold homólogas a POT1 de mamíferos e sugere-se que são formadas por ambas as extremidades de fita simples igualmente abundantes. Enquanto em humanos a volta-T é composta por DNA telomérico ligado a seis proteínas, no *C. elegans*, foi encontrado somente uma proteína homóloga à primeira dobra OB1 de POT1 humana, CeOB2 (Pot-1) e três com a segunda dobra OB2, CeOB1(Pot-2), Pot-3 e Mrt-1 (MEIER *et al.*, 2009; RAICES *et al.*, 2008; SHTESSEL *et al.*, 2013). Estas estruturas protéicas possuem afinidades para propriedades específicas de ligação no DNA. CeOB1 exibiu forte ligação para as repetições teloméricas da extremidade 3', enquanto CeOB2 era menos seletivo e também ligava-se à sequência telomérica rica em C na extremidade 5' (RAICES *et al.*, 2008).

Estas proteínas têm papéis distintos sobre o comprimento dos telômeros. Estudos mostraram que cepas do nematódeo que foram suprimidos tanto para CeOB1 como para CeOB2, ou ambas, apresentaram telômeros maiores, o que sugere a regulação negativa destas proteínas sobre a telomerase. Porém os animais que tiveram apenas a supressão de CeOB2, apesar de telômeros maiores, apresentaram heterogeneidade no comprimento e erosão progressiva telomérica, o que indica o efeito protetor desta proteína e o desencadeamento de um fenótipo ALT, sugerindo que *C. elegans* pode contribuir como modelo para estudos das vias de manutenção dos telômeros. Dados publicados por Meier e colaboradores (2009), mostraram que a falta de Mrt-1 prejudicou na atividade da telomerase e a resposta a danos no DNA. Em contraste com as outras proteínas, a supressão *pot-3* não teve um efeito evidente no comprimento dos telômeros (RAICES *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2012; SHTESSEL *et al.*, 2013). As proteínas teloméricas encontradas no *C. elegans* e sua homologia com hPOT 1 então descritas na figura 9.

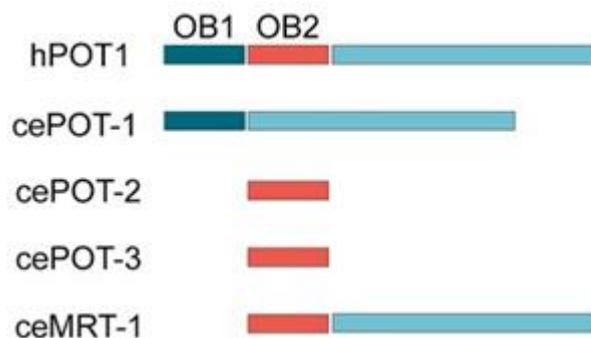


Figura 9. Esquema das proteínas teloméricas do nematódeo *C. elegans*. Adaptado de (SHTESSEL et al., 2013).

Neste contexto, *C. elegans* é um modelo genético para o estudo de muitos processos biológicos conservados evolutivamente, principalmente o envelhecimento. Seu uso como modelo experimental multicelular para estudar a função dos telômeros já se mostrou viável, além de não sofrer as desvantagens de mamíferos, tornando-o um sistema ótimo para investigar uma possível relação entre os mecanismos do complexo telomérico submetidos a diversas condições que simulam aspectos moleculares de doenças que necessitam de melhor entendimento (CHENG et al., 2012; RAICES et al., 2008; SHTESSEL et al., 2013).

### 1.3. Principais métodos e a importância da determinação do comprimento telomérico

Durante a década de 70 foi descoberto o envolvimento do encurtamento telomérico com os processos de senescência celular, desde então o telômero é considerado um marcador de idade biológica da célula. A partir desta descoberta, os estudos voltados para a avaliação do comprimento telomérico e das estruturas relacionadas com diversas doenças aumentaram, demonstrando a importância de sua manutenção para a saúde humana e envelhecimento.

A relevância de técnicas laboratoriais confiáveis para medir o comprimento telomérico em diversos contextos é essencial para o avanço das investigações sobre a biologia dos telômeros e os papéis que eles desempenham na fisiopatologia molecular de doenças e do envelhecimento. Os métodos para a quantificação do comprimento telomérico do DNA genômico humano são diversos e apresentam

vantagens e limitações, sendo importante a avaliação anterior da técnica a ser empregada no estudo (MONTPETIT, 2015)

### *1.3.1. Southern Blotting*

O Southern Blotting (SB) é o método tradicional para medida absoluta do tamanho telomérico humano. A técnica parte da detecção do comprimento médio dos fragmentos de restrição terminal (TRF) (KIMURA et al., 2010).

Este método pode utilizar tanto DNA extraído de leucócitos quanto de tecidos. Após a extração, o DNA é digerido de acordo com o tempo das enzimas de restrição utilizadas. Posteriormente, as amostras são aplicadas no gel de agarose e separadas por eletroforese, seguida da transferência para a membrana de nylon e hibridização com sondas radioativas ou biotiniladas específicas para os terminais teloméricos. A membrana é então exposta a raios-X ou quimioluminescência e a detecção de fragmentos de restrição teloméricos são quantificados (KIMURA et al., 2010).

O SB tem capacidade de fornecer uma estimativa absoluta do tamanho dos telômeros em quilobases, além de não requerer a utilização de equipamentos dispendiosos e especializados, o que a torna conveniente. No entanto, esta técnica exige altas concentrações de DNA, o que dificulta a análise em tecidos, é trabalhosa e incapaz de detectar telômeros curtos. Outra limitação do ensaio é a variação do comprimento TRF médio de um laboratório para outro, dependendo das enzimas de restrição utilizadas, que podem gerar resultados superestimados pela inclusão de regiões subteloméricas ou podem ser influenciados por polimorfismos e confundir a interpretação dos dados. Além disso, os ensaios são executados em pequena escala comparando com outros métodos, o que levou pesquisadores a buscar técnicas alternativas (KIMURA et al., 2010).

### *1.3.2. Fluorescência quantitativa de hibridização in situ Q-FISH e Flow-FISH*

Q-FISH é uma técnica de citogenética adaptada da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que se baseia na utilização de sondas fluorescentes que detectam sequências específicas de DNA de interesse, a partir da microscopia de fluorescência. Especificamente para telômeros, Q-FISH combina o método tradicional com o peptídeo ácido nucléico (PNA) marcado com Cy3 ou FITC e um software de análise que quantifica a intensidade de fluorescência. Essa metodologia avalia o comprimento telomérico a partir de células em metáfase ou em núcleos interfásicos, frescas ou congeladas, fixadas em formol e permeabilizadas, sendo capaz de fornecer o comprimento telomérico individual por cromossomo e detectar telômeros criticamente curtos. Q-FISH tem como desvantagem ser uma técnica trabalhosa, cara e tecnicamente exigente, além de ser um procedimento não adequado para grandes estudos epidemiológicos (HENDERSON *et al.*, 1996; RUFER *et al.*, 1998; FERLICOT; YOUSSEF; FENEUX, 2003; SANADA; AIDA; KAWANO, 2012).

No objetivo de estender o rendimento desse ensaio, o Flow-FISH utiliza o mesmo princípio de Q-FISH, no entanto, quantifica a fluorescência média telomérica de uma população de células e as classifica em subpopulações, baseando-se nas dimensões e granulações, através do uso do citômetro de fluxo. No entanto, essa metodologia apresenta limitações. O uso de PNA como sonda pode gerar ligações inespecíficas às estruturas citoplasmáticas, assim, tem sido sugerido o uso de núcleos isolados, em vez de células inteiras. Outra limitação é a aglutinação que pode ocorrer devido ao uso de células em suspensão, o que compromete a adequação de uso para vários tipos de celulares, aplicando-se melhor em amostras de sangue (HENDERSON *et al.*, 1996; RUFER *et al.*, 1998; FERLICOT; YOUSSEF; FENEUX, 2003; SANADA; AIDA; KAWANO, 2012).

A vantagem do Flow-FISH em relação ao Q-FISH, seria o menor tempo para o preparo das células de interesse. Além da análise de citometria de fluxo ser mais rápida e menos trabalhosa que a aquisição de lâminas e análise das imagens em Q-FISH (HENDERSON *et al.*, 1996; RUFER *et al.*, 1998; FERLICOT; YOUSSEF; FENEUX, 2003; SANADA; AIDA; KAWANO, 2012).

### 1.3.3. PCR em tempo real

Todos os métodos de determinação do comprimento dos telômeros têm limitações. Neste contexto, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi adaptada para detectar o comprimento telomérico a partir da amplificação de uma quantidade menor de DNA genômico e em escala de alto rendimento, voltada para estudos epidemiológicos. Dentro dos procedimentos que incluem a PCR em tempo real, foi desenvolvida a técnica de quantificação telomérica relativa por simplex (qPCR) e por multiplex monocromático (MMqPCR), e a quantificação absoluta do comprimento dos telômeros (qPCR absoluta) (CAWTHON, 2002, 2009; O'CALLAGHAN; FENECH, 2011).

A metodologia através da quantificação relativa dos telômeros foi desenvolvida por Richard Cawthon em 2002 e adaptada em 2009 (simplex e multiplex, respectivamente). A partir de iniciadores tradicionais a técnica de amplificação por PCR seria inviável, as sequências iniciadoras iriam se hibridizar, gerando produtos derivados de dímeros de iniciadores. Em 2002, Cawthon solucionou esse problema, através da adaptação de iniciadores que não se hibridizavam. Assim, a técnica de qPCR para quantificação telomérica relativa foi a primeira reação em cadeia da polimerase que permitiu a amplificação dos telômeros e atualmente é a mais utilizada por pesquisadores (CAWTHON, 2002; MONTPETIT, 2015).

A partir de iniciadores modificados e específicos para a região dos telômeros, a qPCR quantifica a proporção média do produto telomérico (T) e o normaliza pelo gene de cópia única (S) em reações separadas (simplex) ou juntas (multiplex), sendo monitoradas através do corante intercalante de fluorescência SYBRGreen. Então a razão  $T/S$  é calculada e os valores encontrados são comparados entre os grupos para fornecer informações, em termos relativos, do comprimento dos telômeros (CAWTHON, 2002, 2009).

Outro método, é a quantificação absoluta do comprimento dos telômeros através da qPCR, adaptado da técnica de qPCR relativa, desenvolvida por O'Callaghan e Fenech (2011). Essa técnica consiste no uso de um oligômero de tamanho fixo, utilizado em uma curva padrão que proporcionam comprimento estimado das amostras em pares de base, gerando valores de comprimentos teloméricos absolutos em vez de relativos (O'CALLAGHAN, FENECH, 2011; MONTPETIT, 2015).

As técnicas a partir de qPCR para quantificação dos telômeros têm como limitação a exigência de DNA de alta qualidade, além de não fornecer valores do comprimento telomérico de um único cromossomo. Porém são amplamente utilizadas, devido ao rendimento, baixo custo, simplicidade perante as outras técnicas e facilidade de acesso (MONTPETIT, 2015).

#### *1.3.4. Análise do comprimento único de telômeros (STELA)*

Um pequeno grupo de telômeros criticamente curtos é capaz de sinalizar a cascata de senescência celular, o que pode gerar a apoptose. A partir disso, e visto as limitações das outras técnicas em medir telômeros mais curtos ou necessidade de recursos elevados e integridade celular, um novo método baseado em PCR chamado análise do comprimento único de telômeros (STELA) foi desenvolvido (BAIRD *et al.*, 2003).

STELA parte da quantificação de um subgrupo de cromossomos e é dividido em duas etapas. A primeira etapa faz uso de iniciadores específicos, denominados 'telorette', que se ligam à extremidade de cada cromossomo. No segundo passo, a técnica de PCR é então realizada a partir da cauda final do telorette, utilizando um conjunto de iniciadores específicos de regiões subtelo méricas. No entanto, devido à complexidade das regiões subtelo méricas e a variação dessas regiões de acordo com cada cromossomo, apenas um pequeno subconjunto de cromossomos atendem os critérios exigidos nesta técnica. Além disso, esse procedimento não é capaz de detectar diferenças no encurtamento entre o grupo de cromossomos utilizados. Então foi desenvolvida uma adaptação da técnica, denominada de Universal STELA, mais sensível e capaz de detectar essas diferenças críticas (BAIRD *et al.*, 2003; CHEUNG *et al.*, 2004). Porém, essas técnicas têm como limitações a incapacidade de medir telômeros longos, são trabalhosas e pouco simples (MONTPETIT, 2015).

#### *1.3.5. Principais métodos de determinação do comprimento dos telômeros no C. elegans*

No nematódeo *C. elegans*, as principais tecnologias utilizadas para a determinação do comprimento telomérico são a análise de fragmentos de restrição terminal (TRF) por Southern blotting, Q-FISH e STELA. Esses processos envolvem as mesmas abordagens utilizadas para outras espécies, distinguindo apenas as sequências de probes específicas que são adaptadas para cada telômero. Entretanto, como já discutido anteriormente, essas técnicas carregam limitações que também podem ser observadas no nematódeo e podem inviabilizar muitos estudos (CHEUNG *et al.*, 2004).

A fim de ultrapassar essas limitações, como já foi visto, para humanos e alguns em mamíferos tem-se desenvolvida a técnica de qPCR para mensuração do tamanho relativo dos telômeros, que demonstrou ter correlação positiva significativa com o método de TRF por Southern Blotting ( $R^2 \geq 0,7$ ) (CALLICOTT; WOMACK, 2006; CAWTHON, 2002). Esse método é o mais popular entre os estudos publicados, no entanto, essa técnica ainda não foi padronizada no nematódeo *C. elegans* (MONTPETIT, 2015). A partir dessas observações, esse estudo considera importante a padronização da qPCR para determinação relativa do comprimento telomérico no *C. elegans*, visando o apreciável interesse em medir de forma eficiente os telômeros, utilizando uma técnica mais acessível e mais rápida nesse modelo.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo geral

Padronizar a técnica de qPCR para quantificação do comprimento relativo telomérico no nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

## 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Adaptar iniciadores teloméricos para *C. elegans*.

2.2.2. Padronização da técnica de qPCR

2.2.3. Verificar a capacidade da técnica em detectar diferentes tamanhos de telômeros entre cepas com comprimentos teloméricos distintos.

2.2.4. Avaliar a especificidade dos iniciadores teloméricos para sequência de telômeros TTAGGC.

### **3. MÉTODOS**

### 3.1. Cepas

As cepas utilizadas neste estudo incluem: o tipo selvagem N2 Bristol, CB3192 e a cepa mutante da telomerase transcriptase reversa YA1059 (Gene: *trt-1*; Alelo: ok410). Os animais foram obtidos a partir do Caenorhabditis Genetics Center (CGC – University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos).

### 3.2. Manutenção e cultura

Todas as cepas foram cultivadas em condições previamente descritas na literatura (BRENNER, 1974). Sob condições laboratoriais padrões, os animais foram cultivados a 20 °C em placas de cultivo 100 mm de diâmetro x 20 mm de altura, em meio sólido NGM (1,7 % de agar, 2,5 mg/mL de peptona, 25 mM de NaCl, 1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,0, 5 mg/mL de colesterol, 1 M de  $\text{CaCl}_2$ , 1 M de  $\text{MgSO}_4$ ), na presença da bactéria *Escherichia coli* cepa OP50 como fonte de alimento.

Para os experimentos, os animais foram sincronizados pelo tratamento com hipoclorito e hidróxido de sódio para a obtenção de ovos (STIERNAGLE, 1999). Cada cepa cresceu por aproximadamente 3 dias até o estágio hermafrodita adulto grávido e coletados em tubos de fundo cônico de 15 mL. Após duas lavagens com água destilada e centrifugação (1000 xg por dois minutos cada lavagem), o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL da solução de sincronização (3,75 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada; 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 10 N; 1 mL de água sanitária comercial) aos animais sedimentados, agitando-se durante 5 minutos. A destruição do tecido adulto foi monitorada sob o auxílio do estereomicroscópio e a reação foi interrompida quando necessária afim da obtenção de ovos íntegros.

Após a lise, completou-se os tubos com M9 (3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5 g/L NaCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ) e posterior centrifugação (1000 xg por um minuto). O *pellet* de ovos foi lavado três vezes com M9. Os tubos com os ovos resistentes a este tratamento foram incubados por 13-16 horas em tampão M9, sob homogeneização constante e na ausência de alimento, para obtenção de vermes no estágio larval L1. Os animais em L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48 h a 20 °C, até atingirem o estágio larval L4.

### 3.3. Extração de DNA genômico

As cepas foram coletadas, lavadas com água Milli-Q autoclavada e centrifugadas (1000 xg por dois minutos cada lavagem), até que o sobrenadante não estivesse turvo. Em seguida, os animais foram lisados durante uma hora a 95 °C em tampão contendo 100 mM de Tris (pH 8,5), NaCl 200 mM, EDTA 50 mM, 0.5 % de SDS, 100 µg/mL de proteinase K e 20 minutos a 65 °C para parar a ação da proteinase K. Após a lise, o extrato foi centrifugado (12.000 xg por cinco minutos a 22 °C), o sobrenadante retirado e transferido para um tubo contendo 400 µL de isopropanol, onde a amostra foi homogeneizada lentamente, diversas vezes até a precipitação do DNA. O tubo com o DNA precipitado foi centrifugado (16.000 xg por 15 minutos a 22 °C), isopropanol descartado e o tubo invertido, para que o *pellet* secasse. O DNA foi ressuscitado em 300 µL de TE (1 M Tris HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.5) e armazenado a 4 °C.

### 3.4. Análise do comprimento dos telômeros

Através do NanoDrop (ThermoScientific®), o DNA genômico foi quantificado e avaliado quanto sua qualidade pelas razões entre as absorbâncias 260/280 e 260/230 e a concentração foi ajustada conforme o experimento. O comprimento dos telômeros do *C. elegans* foi mensurado através da modificação e adaptação dos iniciadores específicos (Tabela 1) descritos anteriormente (CAWTHON, 2002).

Tabela 1. Iniciadores teloméricos específicos utilizados na reação de qPCR no *C.elegans*.

| Genes          | Iniciadores                              |   | Tamanho do fragmento |
|----------------|--|---|----------------------|
|                | Direto (5' → 3')                         | Reverso (5' → 3')                           |                      |
| Telômeros      | GGTTTTTGAGGCTGAGGCTGAGG<br>CGAGGCTGAGGCT | TCCCCACTATGCCTATGCCTATG<br>CCTATGCCTATGCCTA | >76pb*               |
| <b>C44B7.8</b> | GATTGTTCTACCACAAACCAC                    | GAAACGATATGATCCACGTCC                       | 416pb                |
| <b>T09F3.3</b> | AAGCCAGCTTCGATGGACG                      | CCAAGAGACGAGCTTGACG                         | 189pb                |
| <b>F25B4.6</b> | TGACCGAATTCAGTTTACTCC                    | TAATGATGAATTCCGTTCCCG                       | 262pb                |

\*Tamanho mínimo dos fragmentos da sequência telomérica, devido à soma do tamanho dos iniciadores.

Foi estabelecida a curva padrão a partir de uma amostra aleatória de DNA genômico (gDNA) da cepa selvagem N2 para a validação do método. Para isto, realizaram-se diluições seriadas com o fator de diluição de 1,68, gerando cinco concentrações de DNA. Do mesmo modo, também foi estabelecida a curva padrão para os genes constitutivos de cópia única. A curva de dissociação foi analisada ao fim de cada leitura da qPCR para a confirmação da especificidade de cada reação. Para cada placa, três controles negativos em duplicatas foram incluídos para detectar a presença de contaminação por gDNA, falso-positivo, contaminações por reagentes ou possíveis dímeros de iniciadores. São eles: controle sem amostra (NTC), controle sem iniciadores (NPC) e controle sem Taq DNA polimerase.

Para avaliar o desempenho da qPCR, as reações foram analisadas quanto a eficiência, que informa o nível de sensibilidade do ensaio e o coeficiente de regressão linear da curva padrão  $R^2$ , um parâmetro crítico para avaliar a proximidade de ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores de CT das amostras. Quando  $R^2$  representa 1, o valor de Y (CT) pode ser usado para prever com precisão o valor de X (Concentração de DNA). Quanto mais distante de 1, menor a confiança em correlacionar esses dois valores (LIFE TECHNOLOGIES, 2011).

Foram considerados os valores de eficiência próximos de  $R^2$  próximos de 1. O desvio padrão também foi considerado como uma medida de precisão para a reação, as triplicatas que apresentavam desvios maiores que 0,250 foram descartadas.

Os resultados das médias dos CTs das reações teloméricas foram normalizados pela média geométrica dos CTs dos genes constitutivos através do cálculo (CAWTHON, 2002):

$$2^{-(CT(\text{Telômeros}) - CT(\text{média dos genes constitutivos}))}$$

A fórmula fornece a diferença entre a média dos CTs teloméricos e dos genes constitutivos, gerando um  $\Delta CT$  negativo que representa a quantidade de ciclos a mais que o gene constitutivo de cópia única necessita para alcançar a produção máxima de fluorescência dos telômeros. Então, esse valor é convertido para positivo e se torna expoente do fator de amplificação 2, que representa a metodologia da amplificação exponencial da PCR a partir de uma fita dupla de DNA. O valor

encontrado para cada cepa representa o tamanho relativo do telômero e foi usado para comparação.

### **3.5.Reação para a PCR quantitativa**

Comprimento dos telômeros foi determinado a partir das amostras de DNA genômico total do nematódeo *C. elegans*, utilizando-se o método de PCR em tempo real quantitativo previamente descrito em humanos por Cawthon em 2002 e padronizado neste estudo para o uso no modelo experimental *C. elegans*. Essa técnica baseia-se na determinação da média dos CTs do DNA telomérico, normalizado pela média dos CTs de genes constitutivos de cópia única, para garantir o controle endógeno das reações, resultando no comprimento relativo dos telômeros (CAWTHON, 2002).

A PCR dos telômeros e do gene de cópia única foi realizada em placas de 96 poços separadas (CAWTHON, 2002). Na reação telomérica, os iniciadores foram projetados a fim de evitar a formação de produtos de dímeros. A extremidade 5' de cada iniciador telomérico é composta por seis pares de bases que não são complementares à fita molde, enquanto a extremidade 3' se anela perfeitamente; a cada cinco bases complementares a sexta base não se complementa. Nestas condições, o iniciador direto se hibridiza em qualquer trecho disponível de 31 pb ao longo da cadeia de DNA telomérico orientada 5' → 3' em direção ao centrômero. Do mesmo modo, o iniciador reverso se hibridiza com qualquer região complementar de 33 pb ao longo da fita de DNA 5' → 3' sentido a extremidade cromossômica (Figura 10) (CAWTHON, 2002).

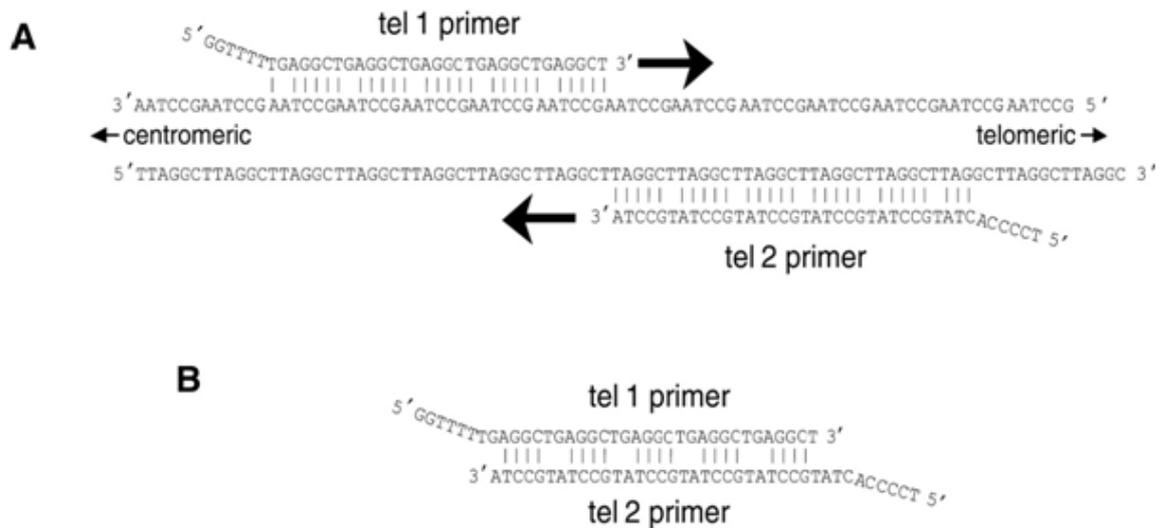


Figura 10. Adaptação do desenho dos iniciadores teloméricos para a técnica de qPCR no nematódeo *C. elegans* (CAWTHON, 2002). A) Hibridização do iniciador direto e reverso com a fita molde. B) Auto-hibridização dos iniciadores. O último par de bases da extremidade 3' não são complementares.

Neste estudo utilizaram-se três genes constitutivos de cópia única, descritos anteriormente na literatura, para controle das reações, que codificam *ATP Binding Protein*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e *HMG-CoA Synthase*, respectivamente (Tabela 1). O desenho desses iniciadores foram os mesmos utilizados no estudo de Barros *et al.* (2014) e já padronizados no laboratório como genes de referência interna no nematódeo (DE BARROS *et al.*, 2014; GILST; HADJIVASSILIOU; YAMAMOTO, 2005; MCCOLL *et al.*, 2010; NEHAMMER *et al.*, 2015).

Para este estudo, cada ensaio de qPCR foi realizado em triplicata das amostras, com 75 ng de DNA por reação. Posteriormente, um mix com os reagentes de PCR foi preparado e subdividido em quatro tubos: um com o par de iniciadores para o DNA telomérico e os demais com os pares de iniciadores para cada gene de cópia única. Cada reação do ensaio foi composta por 50 µL de volume final.

O mix foi constituído por 50 nM ROX, 0,2 x SYBR Green I (Invitrogen), Kit Invitrogen (*Platinum® Taq DNA polymerase* 1,25 U; Buffer 1 x; MgCl<sub>2</sub> 2 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 27 nM do iniciador direto telomérico e 90 nM do reverso. Os iniciadores diretos e reverso dos genes de controle endógenos tinham a mesma concentração de 250 nM cada.

Para todas as reações de qPCR, as leituras de fluorescência foram feitas através do aparelho de PCR em tempo real ABI 7500 PCR (Applied Biosystems®).

As condições dos ciclos foram de 95 °C durante 10 minutos para ativação da Taq polimerase para ambas as amplificações, seguidos de 18 ciclos de 95 °C por 15 seg e 54 °C durante 2 min para as reações teloméricas e 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 2 min.

### **3.6. Testes estatísticos**

Os valores encontrados referentes ao comprimento relativo telomérico de cada uma das três cepas foram organizados em tabela e as médias foram calculadas. O teste Shapiro-Wilk foi realizado a fim de verificar a distribuição dos dados e avaliar qual teste para análise da variância seria o mais adequado.

Os dados apresentaram distribuição normal e a comparação entre os três grupos foi avaliada pelo teste de ANOVA de um fator. Para análise de comparações múltiplas o teste Post Hoc de Tukey foi aplicado, a fim de verificar as diferenças entre os grupos. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o GraphPadPrism 6.0 e as diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

O tamanho do efeito foi avaliado através do teste  $\eta^2$  (ESPÍRITO-SANTO; DANIEL, 2015). Posteriormente o teste  $d$  de Cohen foi aplicado para verificar o tamanho do efeito entre os grupos. E para analisar o poder amostral foi utilizado o Gpower 3.1.92, obtendo-se um poder amostral de 93 %.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Desenho dos iniciadores teloméricos

Os iniciadores teloméricos desse estudo seguiram a mesma estratégia molecular desenvolvida por Richard Cawthon (2002) (anteriormente apresentada na Tabela 1 dos métodos), no entanto, foram adaptados para o nematódeo *C. elegans*, visto que os telômeros do nematódeo possuem na última base da sequência hexamérica citosina ao invés de guanina (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência hexamérica dos Telômeros.

| Organismo         | Telômeros                      |
|-------------------|--------------------------------|
| <i>C. elegans</i> | (TTAGG <u>C</u> ) <sub>n</sub> |
| Humano            | (TTAGG <u>G</u> ) <sub>n</sub> |

#### 4.2. Padronização da técnica de qPCR

Para avaliar o desempenho das reações de qPCR para o comprimento relativo dos telômeros em *C. elegans*, foi realizado uma curva-padrão para cada gene. Para isto, utilizou-se uma amostra aleatória de gDNA de N2, com diluições seriadas (Figura 11). Esta mesma amostra foi usada para gerar curva padrão para cada placa da reação de PCR do presente estudo. A partir dos dados obtidos, o coeficiente linear de cada gene foi determinado, gerando valores próximos a 1, o que representa a capacidade de cada CT (eixo Y) em prever os valores das concentrações de DNA (eixo X), que foi ajustado como modelo preditivo dos dados (LIFE TECHNOLOGIES, 2011).

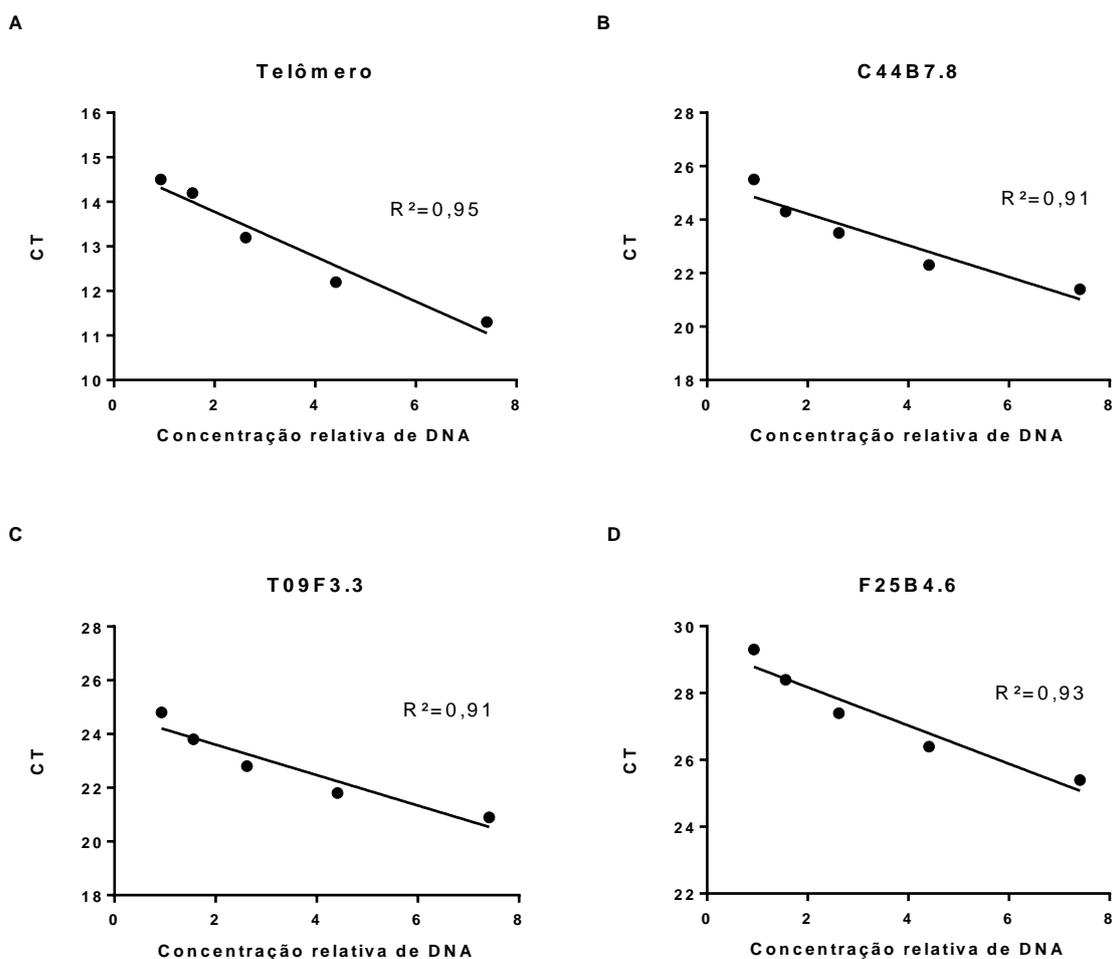


Figura 11. Coeficiente de regressão linear após estabelecimento das curvas padrão para todos os genes. A) Telômeros. B) C44B7.8 C) T09F3.3 D) F25B4.6.

Para acompanhamento das reações de PCR, foi utilizado o corante de fluorescência SYBR Green, que se liga ao DNA de cadeia dupla e sua detecção é mensurada através do aumento da fluorescência ao longo dos ciclos. Este corante tem como vantagem, além do baixo custo em relação a outros fluoróforos, a sua alta sensibilidade a fita dupla de DNA, porém, apresenta baixa especificidade e caso a reação esteja contaminada com outros produtos de DNA ou tenha dímeros de iniciadores, o resultado poderá ser superestimado. Então, a fim de avaliar a especificidade das amplificações, foi utilizada a curva de dissociação após a conclusão das ciclagens. Para produzir esta etapa, a temperatura foi pré-ajustada e fluorescência detectada. Com a elevação da temperatura a fita dupla de DNA se desnatura e o corante dissocia-se, com redução repentina da emissão de fluorescência, resultando na formação de uma curva de dissociação característica

de cada produto conforme o tamanho e a composição do fragmento amplificado. Como esperado para os genes de controle endógeno foi observado um único pico, confirmando a especificidade da amplificação (Figura 12). Na amplificação telomérica são esperados diversos fragmentos, devido à capacidade dos iniciadores se hibridizarem em vários locais ao longo das repetições do DNA telomérico (CAWTHON, 2002, 2009). Conforme o previsto, o pico da curva de dissociação apresentou-se extenso na base, o que sugere a presença de diversos produtos menores, que possuem temperaturas de dissociações próximas.

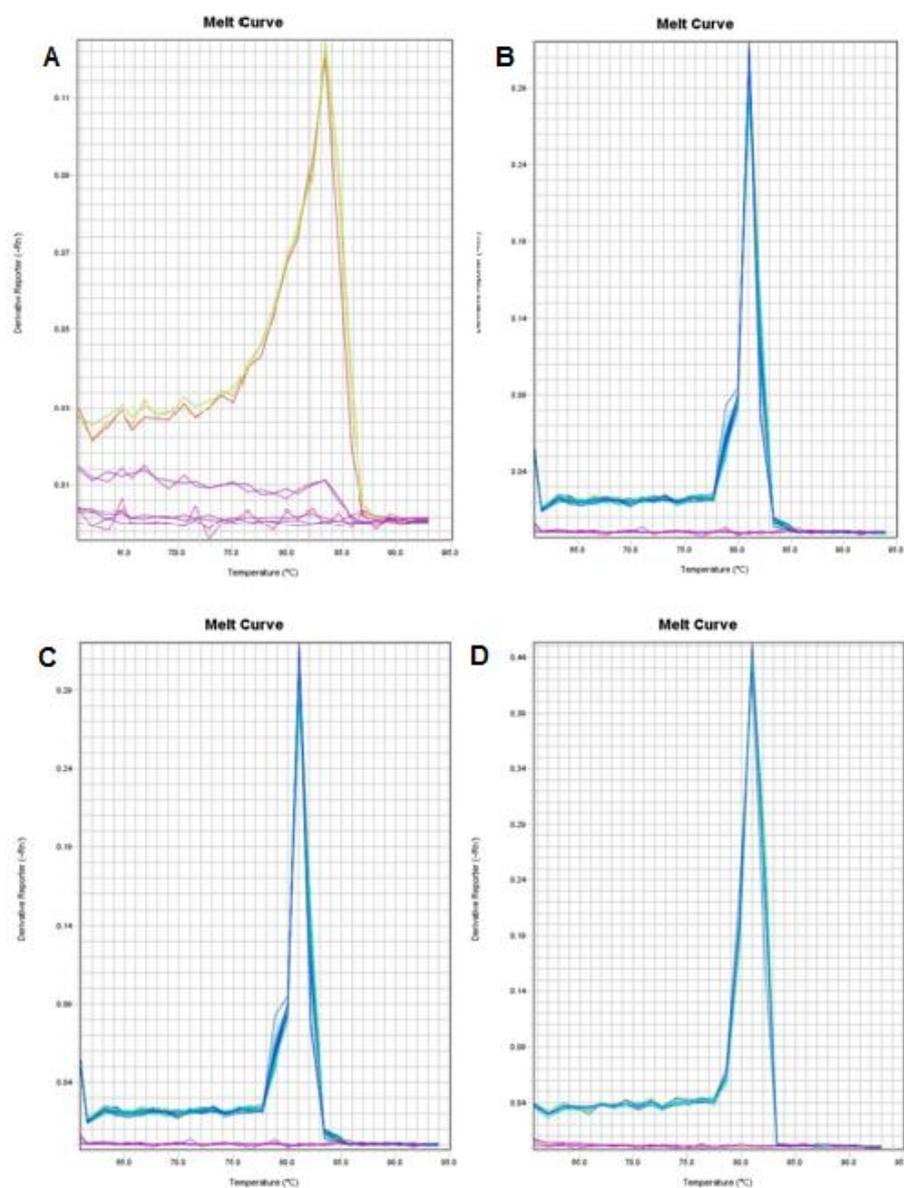


Figura 12. Análise das curvas de dissociação da amostras de referência e dos controles negativos. A presença de um único pico demonstra a especificidade da amplificação de todas as reações. O controle negativo (rosa e roxo) continuou inalterado. A) Telômero. B) C44B7.8 C) T09F3.3 D) F25B4.6

Para confirmar a estabilidade da técnica na detecção do comprimento relativo telomérico em diferentes concentrações de DNA, foi realizada a análise do comprimento nos pontos da curva padrão (Figura 13). Conforme o esperado o tamanho dos telômeros não variaram com a concentração de DNA, mostrando a estabilidade do método.

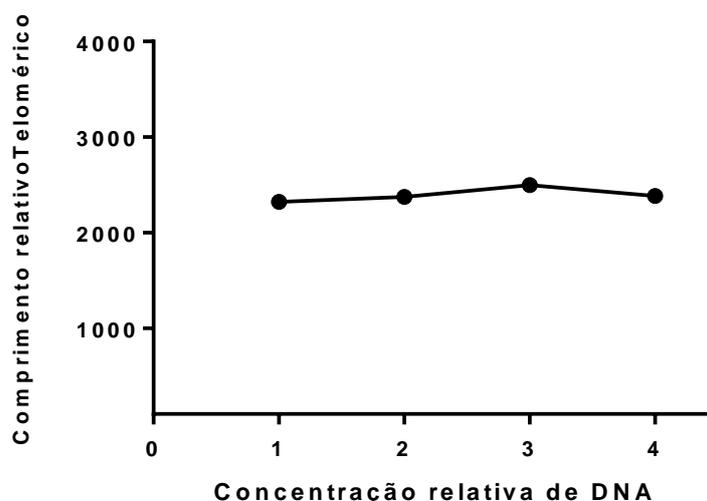


Figura 13. Estabilidade da técnica de qPCR. Ilustração gráfica da quantificação do comprimento relativo telomérico dos pontos da curva padrão.

#### 4.3. Validação da quantificação telomérica por qPCR em diferentes cepas

Um dos objetivos na adaptação do método de qPCR para determinação do comprimento dos telômeros em *C. elegans*, foi verificar se a técnica era capaz de detectar diferentes tamanhos teloméricos. Para isso, três cepas com tamanhos de telômeros distintos (Tabela 3), previamente descritas na literatura, foram utilizadas e o comprimento dos telômeros comparados.

Tabela 3. Caracterização das cepas do nematódeo *C. elegans* quanto ao tamanho telomérico.

| Cepas                   | Tamanho dos telômeros em kb                | Relações dos tamanhos telomérico de acordo com a literatura | Referência                      |
|-------------------------|--|---|---------------------------------|
| <b>CB3192</b><br>(n=8)  | 3,6 kb                                     | CB3192 > N2<br>CB3192 > YA1059                              | (RAICES <i>et al.</i> , 2005)   |
| <b>N2</b><br>(n=7)      | 2,6 kb                                     | N2 < CB3192<br>N2 > YA1059                                  | (RAICES <i>et al.</i> , 2005)   |
| <b>YA1059</b><br>(n=10) | Erosão de 120 pb por geração (20 gerações) | YA1059 < 3192<br>YA1059 < N2                                | (SHTESSEL <i>et al.</i> , 2013) |

Método utilizado SB/TRF.

A análise dos resultados demonstrou diferenças significativas ( $F_{(2,22)} = 3,997$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta^2 = 0,8$ ) no tamanho telomérico entre as cepas (Figura 14). A cepa CB3192 apresentou telômero maior ( $p < 0,0001$ , CB3192 > N2 e CB3192 > YA1059,  $d > 0,8$ ) que as cepas N2 e YA1059. A cepa YA1059 ( $p = 0,0069$ , YA1059 < N2 e YA1059 < CB3192,  $d > 0,8$ ) apresentou menor comprimento do telômero quando comparada às cepas N2 e YA1059. Este resultado demonstra a capacidade da técnica em distinguir tamanhos distintos de telômeros perante diferentes cepas em *C. elegans*.

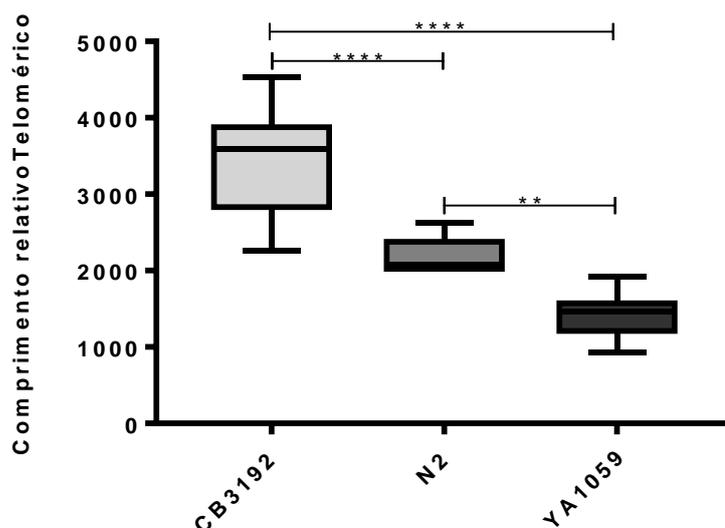


Figura 14. Avaliação do comprimento relativo telomérico entre cepas com tamanho de telômeros distintos. Houve diferença entre as 3 cepas. (Teste Anova *one-way*, Tukey para múltiplas

comparações,  $p < 0,0001$  para CB3192 > N2 e CB3192 > YA1059;  $p = 0,0069$  para N2 > YA1059;  $\eta^2 = 0,8$  e  $d > 0,8$  para todas as comparações).

A fim de avaliar a especificidade dos iniciadores teloméricos quanto à sequência de telômeros (TTAGG**C**) do nematódeo, foi realizado um experimento com o gDNA do *C. elegans*, gDNA de *Escherichia coli* e de humano, nas mesmas concentrações utilizadas, junto a reação de qPCR. Os resultados mostraram que somente na presença do gDNA do *C. elegans* foi possível a amplificação da reação (Figura 15).

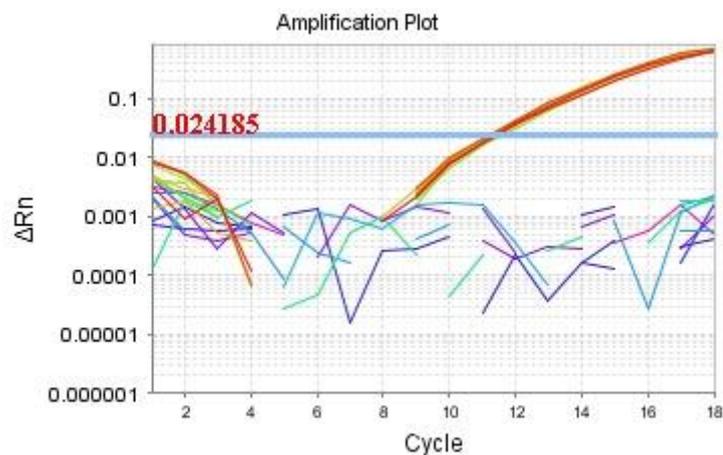


Figura 15. Especificidade dos iniciadores teloméricos. O produto amplificado que ultrapassa o limiar representa amostras que continham gDNA do *C. elegans*, enquanto as linhas de cor azul claro e violeta representam as amostras que continham gDNA humano e de *E.coli*, respectivamente. Os controles negativos permaneceram negativos (cor rosa, roxa e verde água).

## **5. DISCUSSÃO**

Os telômeros encurtam com a idade e a taxa de encurtamento dos telômeros pode indicar o ritmo de envelhecimento e conduzir à senescência. No entanto, o problema de replicação final não é o único indutor desta diminuição. Estudos mostram que os telômeros estão relacionados a influências ambientais, sociais, nutritivas, fisiopatológicas, entre outras, que podem implicar na sua variação de tamanho. Ainda não se tem uma perfeita elucidação do mecanismo de alguns fatores sobre o complexo telomérico e se o encurtamento é causa ou consequência do processo, mas sabe-se que a diminuição está associada ao aumento da incidência de doenças relacionadas à idade (CAWTHON *et al.*, 2003; EPEL *et al.*, 2004).

Considerando os telômeros estruturas chave para a estabilidade cromossômica e, conseqüentemente, para a conservação da integridade do genoma, a perda telomérica gera instabilidade genômica, sendo responsável por fusões e degradações cromossômicas (SHAMMAS, 2011). Nesse contexto, vários estudos já fizeram uso do nematódeo *C. elegans*, a fim de melhor entendimento do complexo telomérico, das estruturas e submissão a diversas condições experimentais, muitas vezes não viáveis em mamíferos ou humanos. Estudos mostraram que *C. elegans* que não expressam os genes para as proteínas teloméricas Pot-1, tiveram seus telômeros expostos a danos enquanto os que não expressavam o gene para telomerase tiveram seus telômeros criticamente encurtados, ficaram inférteis e lidaram com fusões cromossômicas (RAICES *et al.*, 2005, 2008; LACKNER *et al.*, 2012; SHTESSEL *et al.*, 2013).

Apesar da correlação mostrada entre o comprimento dos telômeros e a senescência celular em diversos estudos em mamíferos, um estudo publicado por Raices e colaboradores (2005) utilizando o modelo *C. elegans*, com o método de SB, não encontrou relação entre longevidade e cepas que tinham telômeros maiores, como também não encontrou telômeros aumentados em cepas que tinham uma maior longevidade. O trabalho também avaliou o comprimento dos telômeros no nematódeo, durante o processo de envelhecimento em resposta ao estresse térmico, e não encontrou alteração dessas influências sobre o tamanho telomérico. Assim, de acordo com este trabalho, Raices sugeriu que o comprimento dos telômeros, em geral, não afeta ou prevê a longevidade do organismo.

No entanto, outras publicações em vertebrados, incluindo em células humanas, mostraram que o tamanho telomérico varia ao longo da vida e está

relacionado com a replicação celular. Não seria possível observar este fenômeno no estudo de Raices e colaboradores (2005), visto que o nematódeo foi acompanhado a partir da fase adulta, estágio em que suas células são pós-mitóticas e já estão em senescência (CAWTHON et al., 2003; HEIDINGER et al., 2012; RAICES et al., 2005). Quanto ao estresse térmico, o que questionamos é se este método de estresse foi suficientemente relevante para causar danos teloméricos.

Outros dados publicados, com o uso do nematódeo, sugerem que o nematódeo tem um complexo telomérico semelhante aos mamíferos e sugerem que esse é um excelente modelo para estudar as duas principais vias de manutenção dos telômeros, além do modelo ser facilmente manipulado geneticamente. Esta característica permite o uso do *C. elegans* não como uma ferramenta que irá prever resultados a serem empregados diretamente em humanos, mas como modelo experimental que possibilita simulações de doenças e avaliações de mecanismos moleculares iniciais que possam interferir no tamanho telomérico, para um desenvolvimento de pesquisas porvindouras mais direcionadas e embasadas em modelos vertebrados, objetivando-se uma efetiva aplicação clínica futura (RAICES et al., 2008; CHENG et al., 2012; SHTESSEL et al., 2013).

Assim, existe um interesse considerável em medir o comprimento dos telômeros em seres humanos e no nematódeo *C. elegans*. Dessa forma, selecionar o método de detecção do comprimento dos telômeros mais adequado para um estudo é um passo importante e exige uma avaliação prévia do perfil da pesquisa, levando em consideração a população ou modelo experimental, o tipo de amostra, o tempo de análise e os recursos disponíveis, a fim estabelecer a técnica que melhor representará os resultados com confiança (MONTPETIT, 2015).

Ainda hoje, a determinação do comprimento telomérico por TRF através do SB é considerada referência para muitas espécies, incluído para o *C. elegans*. A maior parte dos trabalhos publicados, utilizando o nematódeo como modelo, faz uso desta técnica, porém, como já discutido anteriormente, essa metodologia traz limitações que inviabilizam muitos estudos, principalmente os que necessitam analisar muitas amostras e têm acesso a pouco gDNA. Além disso, há ainda o problema da superestimação dos telômeros, visto que essa forma de quantificação pode contar com regiões subteloméricas. Essas limitações em humanos e em alguns mamíferos, foram minimizadas com o desenvolvimento da técnica de qPCR para mensuração do tamanho relativo dos telômeros, que demonstrou ter correlação

positiva significativa com o método de TRF por SB [( $r^2 \geq 0,7$ ) (CALLICOTT; WOMACK, 2006; CAWTHON, 2002)].

Contudo, para o *C. elegans*, ainda não há registros de padronização para a técnica de qPCR para o tamanho relativo telomérico, fazendo-se uso de técnicas trabalhosas, demoradas e que não permitem o processamento de muitas amostras ao mesmo tempo (CHEUNG *et al.*, 2004). Seguindo essas observações, esse estudo padronizou e adaptou o método de qPCR (CAWTHON, 2002) para análise do comprimento relativo dos telômeros no nematódeo *C. elegans*, considerando este um grande avanço e uma nova forma de quantificação, que possibilitará analisar amostras em grande escala, de forma mais simples e em tempo hábil.

De acordo com os resultados, o coeficiente linear ( $R^2$ ) obtido para curva padrão de cada gene foi entre 0,95 e 0,91. Esses valores são considerados estatisticamente altos e conseguem explicar o quanto o CT pode ser usado para prever a amplificação de gDNA.  $R^2$  é considerado um parâmetro para avaliação da eficiência de uma reação de qPCR e valores para essa técnica maiores que 0,98 são referidos como otimizados. Nossos dados apresentaram valores abaixo desse ideal, e pode ter como causas potenciais de curva padrão que excede o intervalo linear de detecção, o que não descarta o método (BIORAD, 2006; LIFE TECHNOLOGIES, 2011). Com exceção dos iniciadores teloméricos, que produziram fragmentos de diversos tamanhos, os iniciadores para os genes de controle endógenos utilizados foram específicos para as regiões propostas e produziram um único fragmento. Como já padronizado na literatura (CALLICOTT; WOMACK, 2006; CAWTHON, 2002) os iniciadores para telômeros tem o potencial de se hibridizarem em vários locais da sequência telomérica que apresentem o tamanho mínimo do *primer*. Desse modo, através de controles negativos das reações, monitoramos qualquer possível presença de produtos derivados de iniciadores ou de outros contaminantes. Foram utilizadas duplicatas de reações sem gDNA do verme, reações sem *primers* e reações sem a Taq polimerase, e, para todos os ensaios, os controles permaneceram negativos, garantindo a qualidade da reação.

Os genes de controle endógenos, também conhecidos como genes de referência ou *housekeeping*, são genes constitutivos necessários para a manutenção de funções celulares básicas e normalmente caracterizada por níveis de expressão constante em todas as células e condições do organismo. Os genes de referência interna são amplamente utilizados em PCR em tempo real quantitativa

como normalizadores endógenos, servindo como controle interno de possíveis variações (EISENBERG; LEVANON, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). Para uma normalização adequada e consistente, um gene de referência deve ter expressão constante em todas as amostras investigadas e não deve variar quando submetidos a condições experimentais (EISENBERG; LEVANON, 2013). Neste contexto, para este trabalho, escolhemos genes que já foram padronizados na literatura e em nosso laboratório para o nematódeo *C. elegans* e que, além disso, não apresentavam variações de expressões ou que pudessem divergir entre eles do tamanho telomérico com as cepas utilizadas. Cada um dos três genes escolhidos apresenta os mesmos resultados proporcionais ao observado quando usado os três juntos. Muitos estudos fazem a utilização de um único gene constitutivo de cópia única para cumprir os critérios de normalização endógena de uma reação, porém, segundo a publicação de Hoogewijs e colaboradores (2008), é recomendada a utilização de três genes constitutivos, uma vez que este número permite a quantificação confiável e precisa. No entanto, de acordo com o mesmo estudo, a adição de um quarto gene de referência não melhorou substancialmente o fator de normalização, não havendo necessidade de incluir mais genes de referência.

Cabe destacar ainda que o *C. elegans* é facilmente manipulável geneticamente, o que reforça a importância da avaliação quanto às condições experimentais perante os genes de controle endógeno utilizados especificamente para cada perfil de estudo.

A partir da padronização da qPCR para quantificação dos telômeros, testamos sua sensibilidade em distinguir diferentes tamanhos teloméricos de três cepas distintas e sua especificidade quanto o gDNA do nematódeo. Os resultados obtidos mantiveram a proporção descrita na literatura (RAICES *et al.*, 2005, 2008; LACKNER *et al.*, 2012; SHTESSEL *et al.*, 2013) e a técnica foi capaz de detectar os diferentes comprimentos dos telômeros entre as cepas com um alto tamanho do efeito, além de detectar apenas o gDNA do *C. elegans*. Dessa forma, conclui-se que a padronização torna viável estudos do comprimento telomérico no nematódeo através da PCR quantitativa.

## **6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Nesse contexto, os resultados desse trabalho permitem, concluir que:

- o método de qPCR para determinação do comprimento relativo telomérico foi padronizado e estabelecido para o nematódeo *C. elegans*;
- foi possível detectar a diferença do tamanho dos telômeros para diferentes cepas;
- a partir dos resultados fornecidos por esse estudo, iniciaremos a análise da correlação entre as técnicas qPCR e TRF por Southern Blotting, para validação do método e posterior aplicação a diversas condições experimentais no *C. elegans*, visto que este é um importante modelo de organismo multicelular para estudos e função dos telômeros e seu papel nas diversas patologias e envelhecimento celular.

## **7. REFERÊNCIAS**

ARMANIOS, M. Syndromes of telomere shortening. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 45–61, 2009.

BAIRD, D. M. et al. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. **Nature genetics**, v. 33, n. 2, p. 203–7, 2003.

BELAIR, C. D. et al. Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. **Journal of Urology**, v. 160, n. 2, p. 620–621, 1998.

BIORAD. Real-Time PCR Applications Guide. **Methods**, p. 2–4, 2006.

Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2009). “How chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase”. *Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009*, 1(12), 1–12.

BLACKBURN, E. H.; EPEL, E. S.; LIN, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1193–1198, 2015.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

CALADO, R.; YOUNG, N. Telomeres in disease. **F1000 medicine reports**, v. 4, n. April, p. 8, 2012.

CALLICOTT, R. J.; WOMACK, J. E. Real-time PCR Assay for Measurement of Mouse Telomeres. v. 56, n. 1, p. 17–22, 2006.

CAWTHON, R. et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. **The Lancet**, v. 361, n. 9355, p. 393–395, 2003.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. v. 30, n. 10, p. 1–6, 2002.

CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 1–7, 2009.

CHENG, C. et al. *Caenorhabditis elegans* POT-2 telomere protein represses a mode of alternative lengthening of telomeres with normal telomere lengths. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 20, p. 7805–10, 2012.

CHEUNG, I. et al. Strain-specific telomere length revealed by single telomere length analysis in *Caenorhabditis elegans*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 11, p. 3383–3391, 2004.

CIFUENTES-ROJAS, C.; SHIPPEN, D. E. Telomerase regulation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 730, n. 1-2, p. 20–27, 2012.

CONG, Y.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Human Telomerase and Its Regulation Human Telomerase and Its Regulation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 407, 2002.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

COUNTER, C. M. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 366, n. 1, p. 45–63, 1996.

DAHSE, R.; FIEDLER, W.; ERNST, G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 5, p. 708–14, 1997.

DANCIS, B. M.; HOLMQUIST, G. P. Telomere replication and fusion in eukaryotes. **Journal of Theoretical Biology**, v. 78, n. 2, p. 211–224, 1979.

DE BARROS, A. G. A. et al. Dopamine signaling regulates fat content through  $\beta$ -oxidation in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

EISENBERG, E.; LEVANON, E. Y. Human housekeeping genes , revisited. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 569–574, 2013.

EPEL, E. S. et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. v. 101, n. 49, p. 17312–17315, 2004.

FERLICOT, S.; YOUSSEF, N.; FENEUX, D. Measurement of telomere length on tissue sections using quantitative fluorescence in situ hybridization ( Q-FISH ). n. June, p. 661–666, 2003.

GILST, M. R. VAN; HADJIVASSILIOU, H.; YAMAMOTO, K. R. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. 2005.

GREIDER, C. W. Telomeres do D-loop-T-loop. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 419–422, 1999.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 887–898, 1987.

HAYASHI, M. T. et al. Cell Death During Crisis Is Mediated by Mitotic Telomere Deprotection. **Nature**, v. 6, n. 2, p. 356–372, 2015.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. the Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. **Experimental cell research**, v. 1, p. 585–621, 1961.

HEIDINGER, B. J. et al. Telomere length in early life predicts lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1743–8, 2012.

HEMANN, M. T. et al. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. **Cell**, v. 107, n. 1, p. 67–77, 2001.

HENDERSON, S. et al. Analysis of Changes in Telomere Size during Replicative Aging and Cell Transformation. v. 134, n. 1, p. 1–12, 1996.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–98, 2006.

KIMURA, M. et al. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. **Nature protocols**, v. 5, n. 9, p. 1596–607, 2010.

LACKNER, D. H. et al. Organismal propagation in the absence of a functional telomerase pathway in *Caenorhabditis elegans*. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 8, p. 2024–2033, 2012.

LANGE, T. DE. T-loops and the origin of telomeres. v. 5, n. April, p. 3–9, 2004.

LANGE, T. DE. How Telomeres Solve the. v. 326, n. November, p. 948–952, 2009.

LEVY, M. Z. et al. Telomere end-replication problem and cell aging. **Journal of Molecular Biology**, v. 225, n. 4, p. 951–960, 1992.

LIFE TECHNOLOGIES. Real-Time PCR : Understanding Ct. **Application Note**, n. C, 2011.

LONDOÑO-VALLEJO, J. A. Telomere instability and cancer. **Biochimie**, v. 90, n. 1, p. 73–82, 2008.

LU, W. et al. Telomeres-structure, function, and regulation. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 2, p. 133–141, 2013.

MCCLINTOCK, B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 25, n. 8, p. 405–16, 1939.

MCCOLL, G. et al. Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 260–272, 2010.

MEIER, B. et al. The MRT-1 nuclease is required for DNA crosslink repair and telomerase activity in vivo in *Caenorhabditis elegans*. **The EMBO journal**, v. 1, n. 22, p. 1–15, 2009.

MONTPETIT, A. ET AL. Telomere length: a review of methods for measurement. **Nursing research**, v. 63, n. 4, p. 289–99, 2015.

MULLER, H. J.; ALTENBURG, E. The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*. **Genetics**, v. 15, p. 283–311, 1929.

NANDAKUMAR, J.; CECH, T. R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 69–82, 2013.

NEHAMMER, C. et al. Specific microRNAs regulate heat stress responses in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific reports**, v. 5, p. 8866, 2015.

O'CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biological procedures online**, v. 13, n. 1, p. 3, 2011.

O'CONNOR, C. **Telomeres of Human Chromosomes**. Disponível em:

<<http://www.nature.com/scitable/topicpage/telomeres-of-human-chromosomes-21041>>.

O'SULLIVAN, R. J.; KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 171–81, 2010.

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

OLOVNIKOV, A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. **Doklady Akademii nauk SSSR**, v. 201, n. 6, p. 1496–9, 1971.

RAICES, M. et al. Uncoupling of longevity and telomere length in *C. elegans*. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 3, p. 295–301, 2005.

RAICES, M. et al. *C. elegans* Telomeres Contain G-Strand and C-Strand Overhangs that Are Bound by Distinct Proteins. p. 745–757, 2008.

RUFER, N. et al. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 743–7, 1998.

SANADA, Y.; AIDA, J.; KAWANO, Y. Hepatocellular Telomere Length in Biliary Atresia Measured by Q-FISH. p. 908–916, 2012.

SANDIN, S.; RHODES, D. Telomerase structure. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 25, p. 104–110, 2014.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 1, p. 28–34, 2011.

SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. Ortholist: A compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

SHTESSEL, L. et al. *Caenorhabditis elegans* POT-1 and POT-2 repress telomere maintenance pathways. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 3, n. 2, p. 305–13, 2013.

STEWART, J. A. et al. Maintaining the end: Roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. **Mutation Research -**

**Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 730, n. 1-2, p. 12–19, 2012.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **C. elegans**, v. 2, n. 1999, p. 51–67, 1999.

T.A. CIENCIAS. (2016). What is a Telomere? Disponível em: <<https://www.tasciencias.com/what-is-a-telomere/>>. Acessado dia 15 de jan. 2016.

TISSENBAUM, H. A. Using *C. elegans* for aging research. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 59, n. sup1, p. 59–63, 2015.

TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood.**, v. 124, n. 18, p. 2775–2784, 2015.

WATSON, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. **Nature: New biology**, v. 239, n. 94, p. 197–201, 1972.

WICKY, C. et al. Telomeric repeats (TTAGGC)<sub>n</sub> are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. August, p. 8983–8988, 1996.

WITKOWSKI, J. The myth of cell immortality. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 10, n. 7, p. 258–260, 1985.

WORMATLAS. **Introduction to C.elegans anatomy**. Disponível em: <<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>> .

YOICHEM, J. K. Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–47, 2006.

ZARKOWER, D. Somatic sex determination. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–12, 2006.

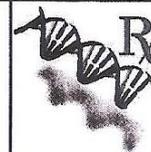
ZHANG, Y. et al. Selection of reliable reference genes in *caenorhabditis elegans* for analysis of nanotoxicity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

## **8. ANEXOS**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA TAYNNÁ EL CURY SILVA

Realizou-se, no dia 22 de julho de 2016, às 09:30 horas, sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO TELOMÉRICO NO Caenorhabditis elegans*, apresentada por TAYNNÁ EL CURY SILVA, número de registro 2014719025, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Débora Marques de Miranda - Orientador (UFMG), Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa Coorientador - (UFMG), Prof(a). Alexandre Guimaraes de Almeida Barros Coorientador - (UFMG), Prof(a). Renan Pedra de Souza (UFMG), Prof(a). Maicon Rodrigues Albuquerque (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 22 de julho de 2016.

*Prof(a) Débora Marques de Miranda*

Prof(a). Débora Marques de Miranda ( Doutora )

*Prof(a) Daniela Valadão Freitas Rosa*

Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa ( Doutora )

*Prof(a) Alexandre Guimaraes de Almeida Barros*

Prof(a). Alexandre Guimaraes de Almeida Barros ( Doutor )

*Prof(a) Renan Pedra de Souza*

Prof(a). Renan Pedra de Souza ( Doutor )

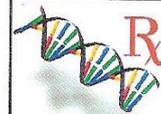
*Prof(a) Maicon Rodrigues Albuquerque*

Prof(a). Maicon Rodrigues Albuquerque ( Doutor )



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DO COMPRIMENTO RELATIVO TELOMÉRICO NO *Caenorhabditis elegans***

**TAYNNÁ EL CURY SILVA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 22 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Débora Marques de Miranda - Orientador  
UFMG

Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa - Coorientador  
UFMG

Prof(a). Alexandre Guimarães de Almeida Barros - Coorientador  
UFMG

Prof(a). Renan Pedra de Souza  
UFMG

Prof(a). Maicon Rodrigues Albuquerque  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de julho de 2016.