

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO INIBIDOR DE TELOMERASE  
MST-312 EM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA.

BRASÍLIA

2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO INIBIDOR DE TELOMERASE  
MST-312 EM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Giselle Pinto de Faria Lopes

BRASÍLIA

2021

KAROLLYNE DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO INIBIDOR DE TELOMERASE  
MST-312 EM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 11 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Diêgo Madureira de Oliveira (presidente)  
Universidade de Brasília

Assinatura eletrônica no processo SEI N° 23106.130833/2020-73

Fabiana Pirani Carneiro  
Universidade de Brasília

Assinatura eletrônica no processo SEI N° 23106.130833/2020-73

Flavia da Cunha Vasconcelos  
Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

Assinatura eletrônica no processo SEI N° 23106.130833/2020-73

Paloma Silva de Souza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Assinatura eletrônica no processo SEI N° 23106.130833/2020-73

Doralina do Amaral Rabello Ramos (suplente)  
Universidade de Brasília

Assinatura eletrônica no processo SEI N° 23106.130833/2020-73

*À todas as mulheres que  
sofrem com o câncer de mama e  
aguardam ansiosamente uma  
resposta da ciência.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, que em sua infinita bondade, sempre me presenteou com pessoas que foram meu apoio durante toda a minha jornada acadêmica desde a mais tenra idade. Por ter colocado no meu caminho professores incríveis, que mesmo em meio a todas as privações das escolas públicas onde estudei, foram pessoas em quem eu pude me inspirar constantemente e até hoje guardo na memória como professores que participaram da construção de quem eu sou hoje. Meus mestres são minha eterna inspiração, e eu tive a sorte de ter muitos professores maravilhosos. Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me trouxeram até aqui e por ele ter me mantido resiliente diante de todos os desafios.

Ao meu orientador, **Dr. Diêgo Madureira**, exemplo de mestre e professor, amigo e um ser humano de um coração sem fim. Por toda a paciência, empatia e confiança depositada em mim. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, mesmo quando eu mesma já teria desistido. Obrigada por esses quase 7 anos de convivência, as conversas filosóficas, os casos trágicos da vida dos quais sempre riamos no final e por todo o amadurecimento profissional e pessoal que você me proporcionou.

À minha coorientadora, **Dra. Giselle Pinto**, um modelo de pesquisadora e de dedicação à ciência séria, pela disponibilidade como profissional e doação como pessoa. Por todos os ensinamentos, horas incansáveis de trabalho e madrugadas animadas no laboratório. Conhece-la elevou meus níveis de exigência quanto ao que desejo como profissional.

À **Dra. Fabiana Pirani** e **Dra. Doralina do Amaral** por comporem a banca de qualificação, pelas ricas sugestões e críticas, que permitiram que boa parte do projeto fosse aprimorada. À **Dra. Doralina** (a quem só consigo chamar de Dora) pela convivência produtiva, com quem eu aprendi muito desde o mestrado e por quem carrego imenso carinho e admiração.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa da **Faculdade de Ceilândia – UnB**, liderados pelo **Dr. Diêgo**, pela união, partilha de tempo e conhecimento com

quem eu tive o privilégio de conviver e aprender. Mesmo em várias adversidades sempre se manteve o espírito de cooperação. Foi muito lindo ver todos crescerem dentro da pesquisa, desde os primeiros ICs, até os títulos, publicações e honras que o grupo conquistou. Tenho muito orgulho de todos vocês.

A todos do **Laboratório de Hemato-oncologia Celular e Molecular do INCA**, em especial à **Dra. Raquel Maia**, por ter me recebido tão bem no seu laboratório. Às **Dra. Flavia da Cunha** e **Dra. Paloma Silva**, por todos os ensinamentos, paciência e alegre convivência, mesmo no curto (e intenso) espaço de tempo. Sem dúvida, são mulheres que eu admiro e tive o privilégio de poder aprender. Ao **Nícolas Jones**, por toda a disponibilidade e paciência em sempre me atender e tirar minhas dúvidas. A todos do **Laboratório de Patologia molecular do câncer**, da **Faculdade de Saúde – UnB**, pelo longo período de convivência e aprendizados.

À minha família, meu refúgio e segurança a quem eu não devo somente este trabalho, mas toda a minha vida. Ao meu esposo, **Álvaro**, por ter me suportado nas crises, por não ter desistido nos momentos mais difíceis, e por ter acreditado em mim desde sempre. À minha mãe, **Silvia**, pelo seu altruísmo, exemplo de doação, a quem eu devo tudo que eu conquistei. Por ter sido a referência materna para as crianças, em todas as minhas ausências em função da minha formação. Você é a pessoa responsável por tudo o que eu tenho e sou, minha eterna inspiração. Espero que um dia possa te orgulhar, tanto quanto eu sinto orgulho de você. Aos meus filhos, **Josué** e **Sarah**, por se tornarem a minha torcida frenética e barulhenta. Ao meu caçula, **Micael**, que já nasceu no período do doutorado e me ensinou que eu posso ser muito mais forte e determinada do que eu um dia poderia imaginar. Aos meus filhos, minha eterna motivação e gratidão.

Aos órgãos e Instituições que possibilitaram esse trabalho, **UnB, INCA, Capes, FAPDF e CNPq**.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

Para que uma célula cancerosa possa proliferar indefinidamente ela deve ser imortalizada, ou seja, desenvolver mecanismos de alongamento dos telômeros. A telomerase é uma enzima que restaura a integridade dos telômeros, e está presente em 85% dos tipos de câncer, o que a torna um potencial alvo terapêutico. Este estudo avaliou o potencial antitumoral do inibidor de telomerase MST-312 em modelo *in vitro* de câncer de mama da linhagem telomerase positiva MDA-MB-231. Foram determinados para a análise: Grupo P (sem tratamento), Grupo D (tratado com o veículo do inibidor) e Grupo M (tratado com o inibidor de telomerase MST-312). Para avaliar o impacto da heterogeneidade tumoral no efeito do MST-312, foi realizada seleção clonal e cultura monoclonal, demonstrando que o padrão proliferativo e a redução da resposta ao inibidor sofrem interferência da heterogeneidade tumoral. Para esclarecer o impacto da exposição ao MST-312 no ciclo celular foi realizado ensaio de avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo onde não foi observado diferença estatística entre os grupos. Foi investigado os efeitos do uso combinado de MST-312 com quimioterápicos como docetaxel, irinotecan e doxorrubicina. Para investigar possíveis mudanças no perfil proliferativo foi realizado o ensaio de cultura celular 3D, onde foi avaliada a viabilidade e o volume dos esferoides. Não houve diferença entre os grupos, sugerindo que a exposição ao MST-312 não interferiu no padrão proliferativo nesse modelo. Com o objetivo de analisar a indução de resistência à múltiplas drogas (MDR) pelo MST-312, foram realizados ensaios de atividade e expressão de proteínas do fenótipo MDR e não foi observado atividade e expressão mensurável dessas proteínas. Os resultados demonstram que a exposição prolongada *in vitro* ao MST-312 não induziu a superexpressão de P-gp/MRP1 e atividade das bombas de efluxo P-gp, MRP1 e BCRP. Este estudo demonstrou que o inibidor de telomerase MST-312 tem potencial citotóxico a curto prazo e que a exposição prolongada sofre interferência da heterogeneidade tumoral, entretanto, o tratamento prévio com MST-312 não sensibilizou as células a ação dos quimioterápicos e não induziu variação significativa da atividade e expressão das bombas de efluxo do fenótipo de resistência à múltiplas drogas (P-gp/MRP1 e BCRP). Os resultados sugerem que o MST-312 pode ser um modelo para o estudo de potenciais drogas inibidoras da telomerase.



**Palavras-chave:** Câncer de mama; Telômero; Telomerase; Inibidor de telomerase; MST-312; resistência à múltiplas drogas.

## ABSTRACT

For a cancer cell to proliferate indefinitely, it must be immortalized, that is, develop telomere lengthening mechanisms. Telomerase is an enzyme that restores the integrity of telomeres, and is present in 85% of cancers, making it a potential therapeutic target. This study evaluated the antitumor potential of the telomerase inhibitor MST-312 in an in vitro model of breast cancer of the positive telomerase lineage MDA-MB-231. The following were determined for the analysis: Group P (without treatment), Group D (treated with the inhibitor vehicle) and Group M (treated with the telomerase inhibitor MST-312). To assess the impact of tumor heterogeneity on the effect of MST-312, clonal selection and monoclonal culture was performed, demonstrating that the proliferative pattern and the reduced response to the inhibitor suffer interference from tumor heterogeneity. To clarify the impact of exposure to MST-312 on the cell cycle, a cell cycle assay was performed using flow cytometry where no statistical difference was observed between the groups. The effects of the combined use of MST-312 with chemotherapeutic agents such as docetaxel, irinotecan and doxorubicin were investigated. To investigate possible changes in the proliferative profile, the 3D cell culture assay was performed, where the viability and volume of the spheroids were evaluated. There was no difference between the groups, suggesting that exposure to MST-312 did not interfere with the proliferative pattern in this model. In order to analyze the induction of resistance to multiple drugs (MDR) by MST-312, assays of activity and expression of proteins of the MDR phenotype were performed and no measurable activity and expression of these proteins was observed. The results demonstrate that prolonged in vitro exposure to MST-312 did not induce overexpression of P-gp / MRP1 and activity of the P-gp, MRP1 and BCRP efflux pumps. This study demonstrated that the telomerase inhibitor MST-312 has cytotoxic potential in the short term and that prolonged exposure is affected by tumor heterogeneity, however, previous treatment with MST-312 did not sensitize cells to the action of chemotherapeutic agents and did not induce significant variation of the activity and expression of the efflux pumps of the phenotype of resistance to multiple drugs (P-gp / MRP1 and BCRP). The results suggest that MST-312 may be a model for the study of potential telomerase inhibitory drugs.

**Keywords:** Breast cancer; Telomer; Telomerase; Telomerase inhibitor; MST-312; resistance to multiple drugs.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Anatomia normal da mama com sua estrutura funcional.....	2
<b>Figura 2</b> – O processo de carcinogênese.....	5
<b>Figura 3</b> – Estrutura do Telômero.....	6
<b>Figura 4</b> – A replicação e o encurtamento do cromossomo.....	8
<b>Figura 5</b> – Estrutura da <i>T-loop</i> .....	9
<b>Figura 6</b> – Desenho esquemático da enzima telomerase e suas proteínas associadas.....	11
<b>Figura 7</b> – Atividades não-canônicas da telomerase e sua relação com as características adquiridas durante a carcinogênese.....	14
<b>Figura 8</b> – Estrutura química do MST-312.....	19
<b>Figura 9</b> – Resultados prévios sobre os efeitos do tratamento de curto e longo prazo na viabilidade celular .....	20
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática da estrutura e domínios das proteínas de transporte ABC.....	24
<b>Figura 11</b> – Mecanismos multifatoriais envolvidos na aquisição de fenótipo MDR.....	25
<b>Figura 12</b> – Desenho experimental do projeto.....	30
<b>Figura 13</b> – Seleção de células por <i>gating</i> .....	36
<b>Figura 14</b> – Tamanho relativo de telômeros.....	40
<b>Figura 15</b> – Micrografia de cariótipos da linhagem MDA-231 após seleção clonal.....	42
<b>Figura 16</b> – Perfil proliferativo da cultura monoclonal de MDA-MB-231 - Clone F9.....	43

<b>Figura 17</b> – Efeitos da associação de MST-312 com Docetaxel ( <b>A</b> ) e Irinotecan ( <b>B</b> ).....	44
<b>Figura 18</b> – Viabilidade metabólica das culturas de células MDA-231.....	45
<b>Figura 19</b> – Painel de micrografias das culturas MDA-231.....	46
<b>Figura 20</b> – Avaliação de ciclo celular das células MDA-231 previamente expostas ao inibidor de telomerase MST-312 por 8 semanas.....	47
<b>Figura 21</b> – Avaliação da viabilidade dos esferoides por APH mensuradas por espectrofotometria ( <b>A</b> ) e Avaliação do volume final dos esferoides de MDA-231 por fotodocumentação em microscópio de contraste de fase ( <b>B</b> ).....	49
<b>Figura 22</b> – Fotodocumentação dos esferoides de MDA-231.....	50
<b>Figura 23</b> – Atividade de P-gp e MRP1 em células MDA-MB-231 ( <b>A</b> ) e Atividade de BCRP em células MDA-231 ( <b>B</b> ).....	51
<b>Figura 24</b> - Dados de expressão de MRP.....	53
<b>Figura 25</b> - Dados de expressão de P-gp.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais proteínas de transporte ABC envolvidas nos mecanismos de resistência a múltiplas drogas.....	23
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABC:** *ATP-binding cassette*

**ABCG2:** *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*

**ALT:** Alongamento Alternativo de Telômeros (*Alternative Lengthening of Telomeres*)

**APH:** *Acid phosphatase*

**ATM:** *Ataxia-telangiectasia mutated*

**ATP:** Trifosfato de Adenosina

**ATR:** *Ataxia-telangiectasia mutated and red3-related*

**BCRP:** Proteína de resistência do câncer de mama (*Breast Cancer Resistance Protein*)

**BRCA1:** Breast cancer 1, early onset

**BRCA2:** Breast cancer 2, early onset

**COX2:** Ciclo-oxigenase-2

**CSA:** Ciclosporina A

**DAPI:** *4,6-diamidino-2-phenylindole diacetate*

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético

**EGCG:** Epigallocatequina galato

**FSC:** *Forward scatter*

**FTC:** *Fumitremorgin C*

**IC<sub>50</sub>:** Metade da concentração inibitória máxima

**kb:** Quilo bases

**kDa:** Quilodalton

**MDR:** Resistência à Múltiplas Drogas (*Multidrug Resistance*)

**MHC:** Major histocompatibility complex

**MIF:** Média de Intensidade de Fluorescência

**MRP1:** *MDR-associated protein 1*

**MST-312:** *N,N'-1,3-Phenylenebis-[2,3-dihydroxy-benzamide]*

**MTT:** *Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium*

**MXR:** *Mitoxantrone resistance-associated protein*

**MYC:** *Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*

**NBD:** *nucleotide binding domain*

**NF-Kb:** Factor nuclear kappa B

**PBS:** Solução Salina Tamponada com Fosfato

**Pgp:** glicoproteína-P (*P-glycoprotein*)

**PhA:** *Pheophorbide A*

**PI:** Iodeto de Propídeo

**PNPP:** *p-nitrofenil fosfato*

**POT1:** *Protection of telomeres 1*

**RAP1:** *Repressor and activator protein 1*

**Rb:** *Retinoblastoma protein*

**Rho:** Rodamina 123 (*Rhodamin 123*)

**RIF:** Razão da Intensidade de Fluorescência

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SDS:** *Sodium dodecil sulfato*

**SFB:** Soro fetal bovino

**SSC:** *Side scatter*

**TDM:** Domínio transmembranar dos transportadores ABC

**TERC:** Componente da telomerase de fita simples de RNA não-codificante (*template* para a síntese dos telômeros)

**TERT:** Transcriptase reversa da telomerase

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor  $\beta$*

**TIN2:** *TRF1-interacting nuclear protein 2*

**TMPyP4:** Inibidor de telomerase 5,10,15,20-tetra-(N-metil-4-piridilo)porfirina

**TPP1:** TINT1/PTOP/PIT1 ou ACD – *adrenocortical dysplasia homolog*

**TRF1:** *Telomeric repeat-binding factor 1*

**TRF2:** *Telomeric repeat-binding factor 2*

**Wt1:** Proteína tumoral de *Wilms*



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 O CÂNCER DE MAMA.....	1
1.2 BIOLOGIA DA CARCINOGENÊSE.....	3
<b>1.2.1 Imortalização Celular</b> .....	5
<b>1.2.2 A Telomerase</b> .....	11
1.3 TERAPÊUTICA ONCOLÓGICA BASEADA NA TELOMERASE.....	15
<b>1.3.1 O inibidor de telomerase MST-312</b> .....	18
1.4 RESISTÊNCIA À MÚLTIPLAS DROGAS.....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA DESTE ESTUDO</b> .....	26
<b>3 HIPÓTESE DESTE ESTUDO</b> .....	27
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	28
4.1 OBJETIVO GERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	29
5.1 SUMÁRIO METODOLÓGICO.....	29
5.2 DETALHAMENTO DAS TÉCNICAS.....	31
<b>5.2.1 Cultura celular 2D</b> .....	31
<b>5.2.2 Tratamento com MST-312</b> .....	31
<b>5.2.3 Análise do tamanho relativo dos telômeros por PCR em tempo real</b> ...	32

5.2.4 Seleção Clonal.....	33
5.2.5 Cariotipagem.....	33
5.2.6 Análise de atividade mitocondrial por ensaio de MTT.....	34
5.2.7 Tempo de duplicação .....	35
5.2.8 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	35
5.2.9 Cultura celular 3D.....	36
5.2.10 Análise de viabilidade metabólica por ensaio de APH.....	37
5.2.11 Análise morfométrica em cultura celular 3D .....	37
5.2.12 Avaliação de atividade das ATPases por citometria de fluxo.....	37
5.2.13 Avaliação da expressão de MRP1 e P-gp por citometria de fluxo.....	38
5.2.14 Análise estatística.....	39
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
6.1 MST-312 E HETEROGENEIDADE TUMORAL.....	40
6.1.1 Avaliação do Tamanho dos Telômeros.....	40
6.1.2 Influência da heterogeneidade celular no efeito do MST-312.....	41
6.1.3 Perfil proliferativo da cultura monoclonal.....	42
6.2 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE MST-312 COM QUIMIOTERÁPICOS – TRATAMENTO DE CURTO PRAZO.....	43
6.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE MST-312 COM QUIMIOTERÁPICOS – TRATAMENTO DE LONGO PRAZO.....	44
6.3.1 Impacto do tratamento com MST-312 no cultivo celular.....	44
6.3.2 MST-312 em associação com Doxorrubicina.....	45

6.3.3 Avaliação morfológica após exposição prolongada ao MST-312.....	46
6.3.4 Avaliação do ciclo celular após exposição prolongada ao MST-312....	47
6.3.5 Formação de esferoides após exposição prolongada ao MST-312.....	48
6.3.6 Atividade de bombas de efluxo após exposição prolongada ao MST-312.....	50
6.3.7 Expressão de bombas de efluxo após exposição prolongada ao MST-312.....	52
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÃO.....	62
9 PERSPECTIVAS.....	63

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ANEXO I**

**ANEXO II**

**ANEXO III**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CÂNCER DE MAMA

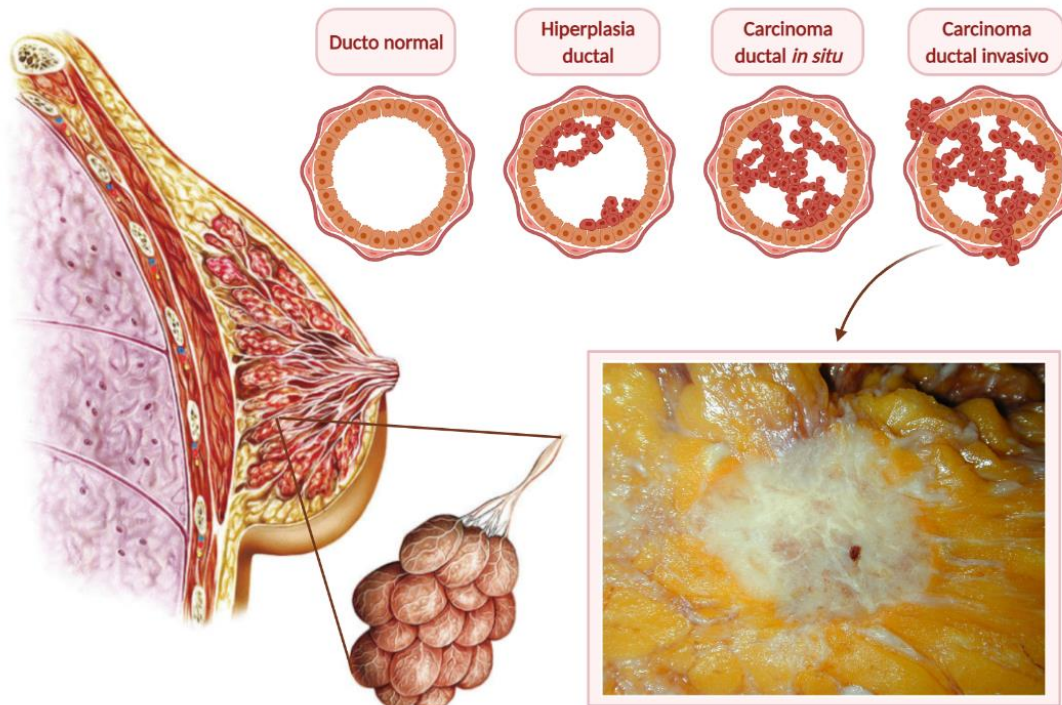
Os dados comprovam que o câncer é um importante problema de saúde pública, oneroso devido aos investimentos em procedimentos e medicamentos de alto custo para terapia oncológica, e com poucas inovações em terapias eficientes e resolutivas (1, 2). O câncer representa uma doença de grande relevância epidemiológica no Brasil e no mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura. Estimou-se mais de 18 milhões de casos novos e 9,6 milhões de óbitos em todo o mundo por câncer para o ano de 2018; no Brasil a expectativa para os anos de 2020-2022 é de 625 mil casos novos de câncer, 450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma (3).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, representando no Brasil 29,7% dos casos de câncer. Estimam-se 66.280 novos casos de câncer de mama para cada ano de 2020-2022 no Brasil, o que representa um risco estimado de 61,61 casos novos para cada 100 mil mulheres, com um risco de óbito de 16,16 por 100 mil mulheres (3). Atualmente, a estratégia mais eficaz contra esse tipo de câncer ainda é a detecção precoce e as políticas de prevenção que impactam diretamente na abordagem terapêutica e no prognóstico. Tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, as políticas de saúde pública, o acesso à saúde, a logística ágil dos serviços de assistência são os determinantes dos desfechos da doença e também das taxas de mortalidade (4).

O câncer de mama é classificado de acordo com a apresentação clínica, seu padrão de gradação histopatológico, marcadores moleculares e outras características que permitem sistematizar o estadiamento e a abordagem terapêutica para cada tipo específico (5). A classificação histológica do câncer de mama tem íntima relação com a própria estrutura anatômica e o tipo celular envolvido no processo neoplásico. Anatomicamente, a glândula mamária é dividida em lóbulos de glândulas túbulo-alveolares entremeadas por tecido conjuntivo e tecido adiposo; cada lóbulo possui seu próprio ducto excretor ou galactóforo (Figura 1). As características

da mama variam conforme a condição fisiológica da mulher como menarca, idade fértil, gestação, lactação e menopausa (6). O câncer de mama dos tipos carcinoma ductal infiltrante e carcinoma lobular infiltrante compreendem os tipos de câncer invasivos mais frequentes (7).

Além da classificação histológica, recentes avanços na abordagem diagnóstica por biomarcadores permitem classificar o câncer de mama em níveis genômicos e proteômicos, aprimorando a avaliação das possibilidades de tratamentos e predizendo os prognósticos (5) e ampliando os conhecimentos acerca da heterogeneidade desses tumores. A heterogeneidade intratumoral consiste na presença de diversas populações de células dentro do mesmo tumor com características distintas quanto a tumorigenicidade, resistência ao tratamento e potencial metastático (14). A heterogeneidade dos tumores de mama tem sido exaustivamente estudada como forma de explorar essas características para orientar a estratégia terapêutica e farmacológica (5, 8).



**Figura 1** – Anatomia normal da mama com sua estrutura funcional (o lóbulo): no detalhe acima, a evolução do carcinoma ductal. No destaque, a imagem com peça anatômica ilustrando o aspecto macroscópico clássico do carcinoma invasivo, caracterizado por contornos irregulares (Foto: Acessado em 12/02/2021 <https://www.sbmastologia.com.br/medicos/ebooks/ebook-teste/>).

O câncer de mama é uma doença de causa multifatorial, dentre eles: Fatores individuais como idade superior a 50 anos, vida reprodutiva, idade da menarca, períodos de amenorreia, menopausa tardia, maternidade e lactação, história familiar positiva de câncer de ovário e mama (3), estilo de vida que inclui alimentação, sedentarismo, obesidade, consumo excessivo de álcool e tabagismo (4, 6, 9, 10).

Dentre os fatores de risco genéticos que contribuem para o surgimento do câncer de mama estão as mutações nos genes BRCA1 (*Breast cancer 1, early onset*) e BRCA2 (*Breast cancer 2, early onset*) (11, 12). Os genes BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor localizados no cromossomo 17q e 13q respectivamente e são responsáveis pela expressão de fatores que inibem o crescimento celular, atuam no controle do ciclo celular, regulação da transcrição gênica e apoptose. As mutações BRCA1 tem prevalência de aproximadamente 14,5% e BRCA2 de 8,3%. O risco cumulativo de desenvolver câncer de mama em mulheres com mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 pode chegar a mais de 50% quando comparado com indivíduos que não tem a mutação (13).

## 1.2 BIOLOGIA DA CARCINOGENESE

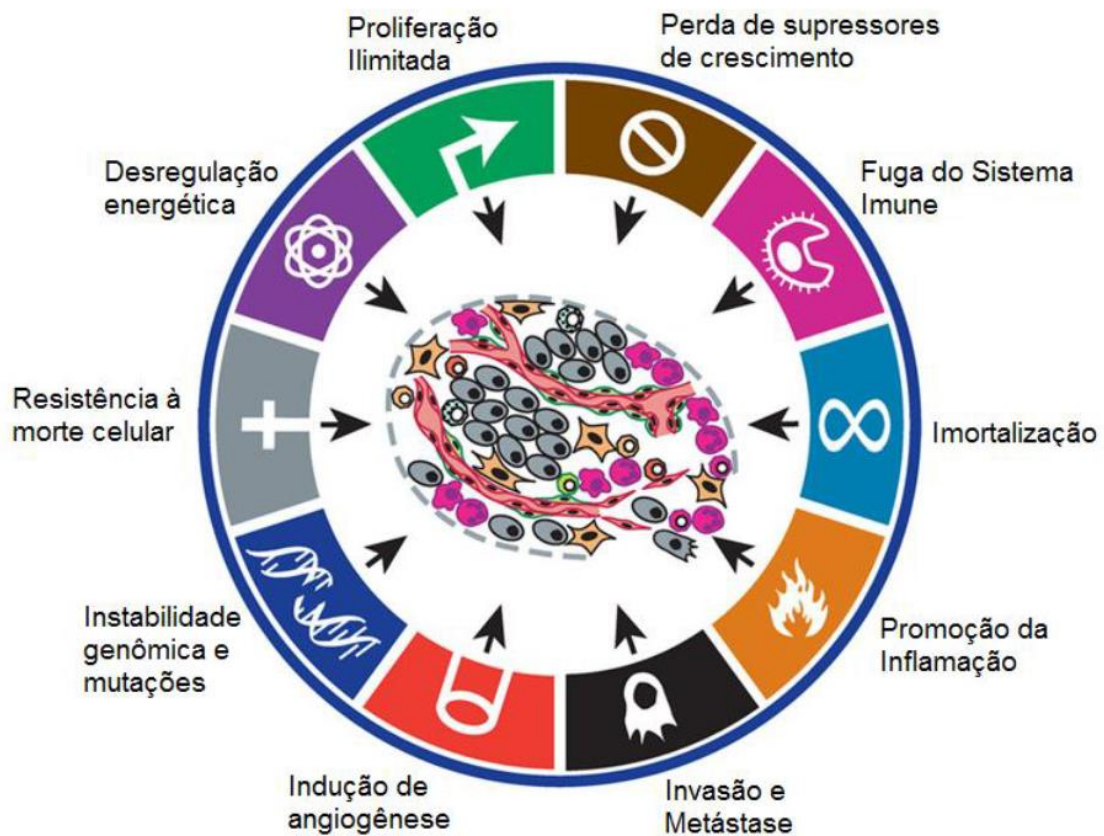
A particularidade biológica marcante das células cancerosas é o crescimento descontrolado. Essas células possuem características intrínsecas que as distinguem das células somáticas normais pela sua capacidade de proliferação celular ilimitada, com potencial de migração e colonização de outros tecidos e órgãos, por um processo denominado metástase. As características que tornam a célula cancerosa são adquiridas ao longo do processo biológico conhecido como carcinogênese, como ilustrado na Figura 2 (15).

As células somáticas sadias possuem seu ciclo celular cuidadosamente controlado por mecanismos que impossibilitam a replicação ilimitada, impedindo assim a perpetuação de erros e danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico). Também apresentam uma inibição natural à proliferação quando em contato com outras células, permitindo a manutenção da estrutura característica dos tecidos e a arquitetura do parênquima dos diversos órgãos. As células cancerosas, porém, são

células geneticamente instáveis, com ampla heterogeneidade intratumoral e relevante acúmulo de mutações sucessivas que lhe conferem vantagens proliferativas (16, 17); a interação entre células nessa situação pode estimular a liberação de fatores de crescimento e a superexpressão de receptores para esses mesmos fatores (18).

Os caminhos pelos quais as células cancerosas inibem os mecanismos de regulação da proliferação estão apenas parcialmente elucidados. Modelos experimentais tem demonstrado a importância de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor na participação da desregulação dos sistemas de controle relacionados à sinalização da proliferação celular (19). A resposta inflamatória que é gerada localmente favorece o tecido neoplásico, promovendo a angiogênese e liberando fatores de crescimento (18, 20). Ocorre desregulação energética, instabilidade genômica e acúmulo de mutações. Essas características demonstram a complexidade dos microambientes tumorais e a dinâmica única e extremamente adaptável às condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento.

Os mecanismos de reparo do DNA podem disparar a apoptose (morte celular programada) quando a célula possui erros incorrigíveis no seu material genético, erros estes que comprometem o complexo equilíbrio intracelular, impedindo assim que mutações sejam perpetuadas às células filhas (21). No início da carcinogênese, o processo de autofagia desencadeado por genes supressores de tumor pode apresentar alguma eficácia, mas em determinadas circunstâncias, permite que essas células fiquem quiescentes. Quanto maior a taxa de proliferação, maiores as chances de dano ao DNA. Células cancerosas são capazes de inibir progressivamente a apoptose, mesmo em condições de intensa proliferação, seja pela expressão de fatores anti-apoptóticos ou regulação negativa dos fatores pró-apoptóticos (22-24).



**Figura 2** – O processo de carcinogênese: Características adquiridas pelas células cancerosas que possibilitam a formação e a expressão clínica do câncer. Adaptado (15).

Células saudáveis têm potencial proliferativo limitado, obedecendo a um número determinado de ciclos. Quando, por complexa combinação de mutações, a célula adquire a capacidade de transpor esses obstáculos fisiológicos e apresenta a habilidade de proliferação ilimitada, ela se torna imortalizada (14, 15).

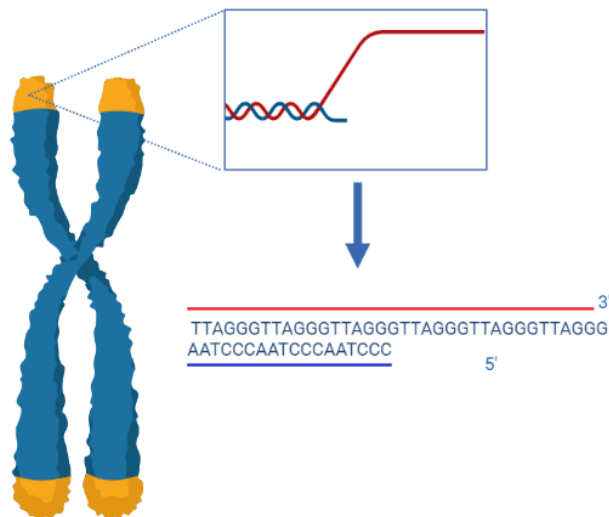
### 1.2.1 Imortalização Celular

A imortalização celular é uma característica de todas as células cancerosas (15, 25). Conhecer profundamente e intervir nos complexos mecanismos que permitem a imortalização celular pode ser crucial para determinar a terapêutica precoce, impedindo o avanço da doença, a formação de metástases e possibilitando desfechos favoráveis.



O alongamento dos telômeros é uma etapa essencial no processo de proliferação ilimitada. O telômero consiste em uma estrutura de complexos nucleoprotéicos organizados em repetições consecutivas de nucleotídeos (repetições em *tandem*), ricas em guanina, variando de 6-20 kb (quilo bases), localizados na porção final dos cromossomos (Figura 3) (25-29). Telômeros de células somáticas adultas são compostas em média por 1000 a 2000 repetições do *tandem* associadas aos complexos de proteínas *shelterin* (proteínas acessórias) (30-32).

A diversidade do *tandem* pode variar dentro do próprio telômero, sendo predominante o hexanucleotídeo 5'-TTAGGG-3' (onde T é timina; A é adenina e G é guanina), com variações distais da sequência GTAGGG e TTCGGG e variações proximais TTGGGG, TGAGGG e TCAGGG (33), com o centrômero como referência. Essas variações da sequência clássica são essenciais para a formação de estruturas tridimensionais complexas de DNA chamadas de G-Quadruplex (34), que consistem em uma arquitetura secundária de tetrâmeros de guanina unidas por ligação de hidrogênio. Essa conformação adquirida pelo telômero regula o acesso de enzimas e tornam a sua estrutura mais estável (34-36).



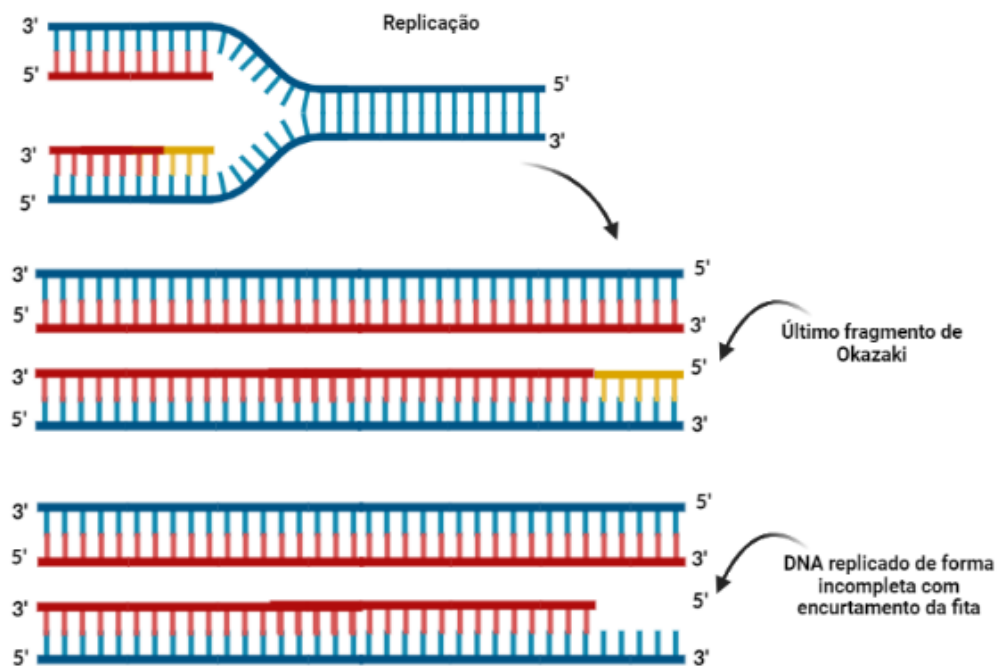
**Figura 3** – Estrutura do Telômero: Localização na porção final do cromossomo e esquematização da sua conformação com a sequência de repetições do *tandem* e a fita 3' se estendendo além da fita 5'.

O telômero também apresenta proteínas *shelterin*: TRF1 (*telomeric repeat-binding factor 1*), TRF2 (*telomeric repeat-binding factor 2*), RAP1 (*repressor and*

*activator protein 1*), TIN2 (*TRF1-interacting nuclear protein 2*), TPP1 (*TINT1/PTOP/PIT1* ou ACD – *adrenocortical dysplasia homolog*) e POT1 (*protection of telomeres 1*) que atuam na formação dos complexos nucleoprotéicos (25, 31, 32, 37). O complexo de proteínas *shelterin* protege os telômeros dos mecanismos de vigilância de danos ao DNA, incluindo as vias de reparo relacionado às proteínas quinases ATM e ATR e as vias de reparo de quebra de cadeia dupla (*non homologous end-joining and homology-directed repair*) e estão diretamente relacionadas à estabilização do telômero (31, 38, 39). As proteínas TRF1, TRF2, RAP1 e TIN2 interagem com a fita dupla enquanto TPP1 e POT1 interagem com a fita simples do telômero.

Os telômeros tem como função essencial proteger o material genético de quebras inadvertidas e da ação das enzimas nucleases (40, 41). A cada replicação celular, todo o material genético é estendido até a extremidade 5', porém na fita correspondente onde ocorre a replicação tardia, não é possível fazer uma cópia completa sem a participação de iniciadores (*primers* de RNA), que compreendem pequenas sequências independentes onde o processo enzimático é iniciado. Ao final da replicação sempre permanece uma região no final do cromossomo que não pode ser sintetizada, uma lacuna nos terminais teloméricos dos fragmentos de Okazaki que corresponde ao seguimento onde o iniciador estava ligado. Como resultado, tem-se uma pequena região na extremidade 3' do DNA com replicação incompleta, faltando uma pequena porção na fita tardia. Esse mecanismo foi denominado "o problema da replicação" (42-44) como ilustrado na Figura 4.

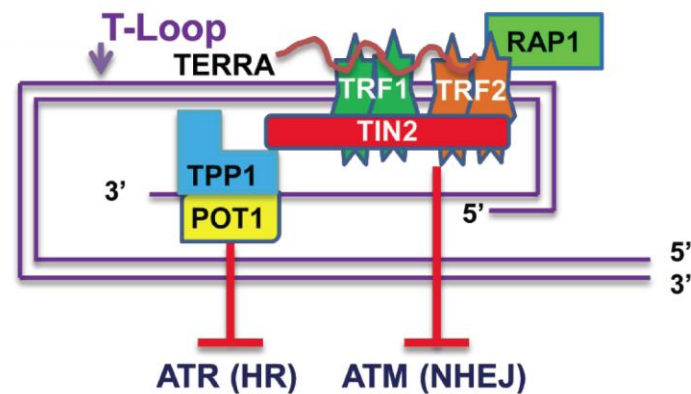
Entretanto, a extremidade 3' do telômero se estende além da fita 5', o que compensa a pequena porção que se perde a cada replicação. Essa extensão da fita 3' se dobra formando uma estrutura chamada *T-loop*, ou alça, que serve para recolher essa ponta de cromossomo sem uma fita correspondente dentro da porção 5' (Figura 5). Sozinha, a fita 3' pode ser reconhecida pelos mecanismos de reparo da célula como quebra de cadeia dupla (25, 44, 46).



**Figura 4** – A replicação e o encurtamento do cromossomo a cada ciclo. Adaptado (45).

A cada replicação da célula o telômero perde em média cerca de 50 a 100 pares de bases, o que ao longo do tempo compromete o seu comprimento e inviabiliza a formação da *T-loop*, induzindo a célula a entrar em um estágio de parada proliferativa (25, 41, 47, 48), um fenômeno conhecido como *Limite de Hayflick* ou senescência replicativa (47). Por consequência, o DNA de fita simples sem uma fita correspondente torna-se vulnerável aos mecanismos de reparo, desencadeando inúmeros eventos que culminam em crise telomérica, aberrações cromossômicas e morte celular (49). Esse mecanismo pode ter uma relevância evolutiva nas estratégias celulares de prevenção ao crescimento desordenado dos tecidos (50, 51).

Além de proteger estruturalmente a fita de DNA, os componentes associados desempenham papel importante na função e regulação do comprimento dos telômeros (52, 53). Modificações em TRF1 ou TRF2 podem alterar significativamente a estrutura telomérica (41, 52-54) pois estes atuam na manutenção da integridade do telômero; quando POT1, TRF1 e TRF2 não funcionam corretamente, a estrutura de *T-loop* perde sua conformação e expõe as fitas dos cromossomos, disparando os mecanismos de resposta aos danos ao DNA (34, 55, 56).



**Figura 5** – Estrutura da *T-loop*: Fita 3' se estendendo além da fita 5' e mostrando a sua relação com as proteínas *shelterin*. Adaptado (25).

Devido ao sentido em que ocorre a replicação, o telômero encurta a cada ciclo em sua extremidade 3', limitando a capacidade proliferativa e levando à célula normal a disparar os mecanismos de senescência e apoptose quando não é mais possível a formação da *T-loop*. Caso a proliferação se perpetuasse, o encurtamento das fitas se tornaria tão crítico que porções do DNA poderiam ser perdidas no processo de replicação, ou poderiam ocorrer recombinação errônea do DNA ou eventos de fusão aleatórios (46), expondo a célula a danos irreversíveis ao seu material genético (25). O telômero na porção final do cromossomo atua como uma estrutura sentinela, que dispara a apoptose antes que o DNA seja danificado. Sendo assim, os telômeros estão intimamente relacionados com o processo de immortalização celular, pois funcionam como uma espécie de relógio biológico natural que impõe um limite para a replicação da célula (15, 57).

A redução telomérica é considerada uma das principais responsáveis pelo envelhecimento celular que desencadeia os mecanismos de senescência e incapacidade permanente para a proliferação (41, 44, 58). Após 50 divisões aproximadamente os telômeros podem atingir um comprimento criticamente curto e induzir uma resposta de dano ao DNA (47). Telômeros de células-tronco que tem sua integridade seriamente danificada esgotam a sua capacidade de auto renovação, demonstrando a importância dessas estruturas no seu contexto fisiológico e corroborando com os estudos de immortalização em situações patológicas (59). A erosão progressiva dos telômeros até condições críticas, ativa a resposta dos mecanismos de reparo de DNA e induzem a senescência celular.

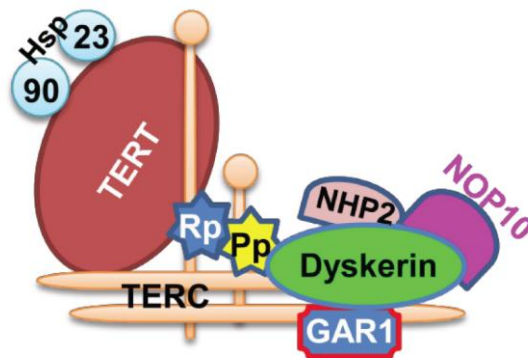
A imortalização celular que ocorre nas células cancerosas consiste justamente em mecanismos para alongar o telômero, inibir o relógio biológico e proliferar indefinidamente. Enquanto o telômero perde pequenas porções pela replicação, é continuamente alongado para repor essas mesmas porções, protelando a apoptose. Aproximadamente 85% dos tumores fazem uso da via clássica de imortalização, que consiste na expressão da enzima telomerase e a minoria usa uma estratégia conhecida como alongamento alternativo de telômeros ou ALT – *Alternative lengthening of telomeres* (60-62), que compreende inúmeros mecanismos celulares que ainda não foram completamente elucidados (63-65).

As células replicam até tornarem seus telômeros excessivamente curtos, induzindo a resposta de dano ao DNA. Ocorre ativação dos pontos de verificação do ciclo celular promovendo a senescência e apoptose. Os *checkpoints* TP53-CDKN1A e CDKN2A-pRB são os principais envolvidos na parada do crescimento. Uma alta taxa de proliferação pode causar sérias mutações nesses genes, comprometendo a resposta de reparo e a capacidade de indução de senescência (41, 66). As células tornam-se capazes de contornar os mecanismos de senescência, desativando a maquinaria de vigilância como a p53 e Rb (*retinoblastoma protein*) (46, 67), culminando em crise telomérica (46, 68).

Nessas condições ocorre uma instabilidade genômica maciça com telômeros de tamanho crítico, rearranjos cromossômicos, fusões de extremidade de cromossomos, quebras de cromossomos (*breakage-fusion-bridge cycles*) e outras aberrações (46, 69). Esse cenário causa a apoptose da grande maioria das células. Algumas raras células que sobrevivem, o fazem por estabilizar o seu genoma a partir da ativação dos mecanismos de alongamento dos telômeros com a indução de expressão de telomerase ou ALT (25, 70-73). A imortalização pela ativação da telomerase é em geral o estágio que antecede a transformação carcinogênica para a replicação ilimitada (74).

### 1.2.2 A Telomerase

A telomerase é uma enzima ribonucleoproteína *transcriptase reversa* específica composta por uma subunidade catalítica (TERT), um componente RNA (TERC) e proteínas acessórias (75, 76). A TERT é uma proteína que contém um sítio com atividade catalítica responsável pela atividade enzimática da telomerase. O seu componente de RNA de fita simples não-codificante contém o modelo de sequências (AAUCCCAAU) que é o molde *template* através da qual a telomerase pode estender as repetições teloméricas e produzir novas sequências do *tandem*, alongando o telômero (25, 30, 61, 62, 70, 77). A telomerase apresenta proteínas acessórias que estabilizam o complexo proteico, composto por DKC1, NHP2, NOP10 (Figura 6).



**Figura 6** - Desenho esquemático da enzima telomerase e suas proteínas associadas. (25)

A TERC é expressa em todas as células somáticas, enquanto o gene TERT tem sua transcrição fortemente reprimida na grande maioria das células. O componente catalítico TERT foi primeiramente descrito em leveduras e posteriormente em humanos, e atualmente tem sua estrutura e domínios funcionais bem caracterizados (78-80). A transcrição do gene TERT em condições fisiológicas tem íntima relação com os fatores de transcrição da família MYC e sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina. Estudos sugerem que as proteínas da família MYC/MAX/MAD1 estão envolvidas na transcrição de TERT tanto em células normais como em células de câncer assim como a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (75, 81-84).

A desinibição do gene TERT e a consequente expressão da enzima telomerase representa o mecanismo mais comum de imortalização celular no processo de carcinogênese. Inúmeras estratégias moleculares são utilizadas para estimular a desinibição do gene TERT como perda da supressão tumoral, ativação de sinais oncogênicos, oncoproteínas exógenas (derivadas de vírus tumorais), alterações epigenéticas no *locus* TERT, transativação, *splicing* aberrante do mRNA, alterações genéticas como mutações, hipermetilação, rearranjos e amplificação de genes (25, 61, 62). Mutações na região promotora como 288C>T e 250C>T fornecem motivos de ligação adicionais para os fatores de transcrição, regulando positivamente a expressão de TERT e aumentando a atividade da telomerase (70, 85). Além da família MYC/MAX/MAD e da via Wnt/ $\beta$ -catenina (82), outros fatores podem estar indiretamente envolvidos na promoção da transcrição do gene TERT assim como estrogênio, fatores de crescimento, COX2, survivina, citocinas, dentre outros (25, 61, 62, 86, 87). Fatores inibidores atuam fisiologicamente suprimindo a transcrição de TERT, como WT p53, WT1, TGF- $\beta$ , e podem ter algum envolvimento na carcinogênese, quando há uma ampla inativação de supressores de tumor (83, 88).

O gene de TERT fica no braço curto do cromossomo 5 e apresenta sítio único de início de transcrição possuindo 16 éxons e 15 íntrons. Mecanismos de *splicing* alternativo regulam a telomerase a nível pós-transcricional, com 3 sítios de exclusão ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e 4 sítios de inserção (25). Embora existam 22 variantes resultantes do *splicing* de TERT, elas não têm atividade catalítica ativa como polimerase *transcriptase reversa* na manutenção do telômero (89-91). A expressão das variantes de TERT em células cancerosas pode sugerir que elas possuem um papel biológico ainda pouco estudado (74).

A telomerase apresenta funções ditas canônicas e não canônicas. A principal função da telomerase, ou função canônica, é a manutenção dos telômeros evitando a instabilidade genômica que pode disparar os mecanismos de apoptose. A telomerase sintetiza mais sequências do *tandem* no telômero, aumentando seu comprimento (92, 93). Essa atuação tem relevante importância fisiológica em pequenos conjuntos de células altamente proliferativas que replicam inúmeras vezes devido ao contexto em que estão inseridas como células germinativas, células tronco/progenitoras, linfócitos ativados e células no período embrionário (25, 41). Nesses tecidos específicos a

expressão da telomerase apresenta um controle rígido e ocorre o silenciamento gênico após a diferenciação celular (94, 95).

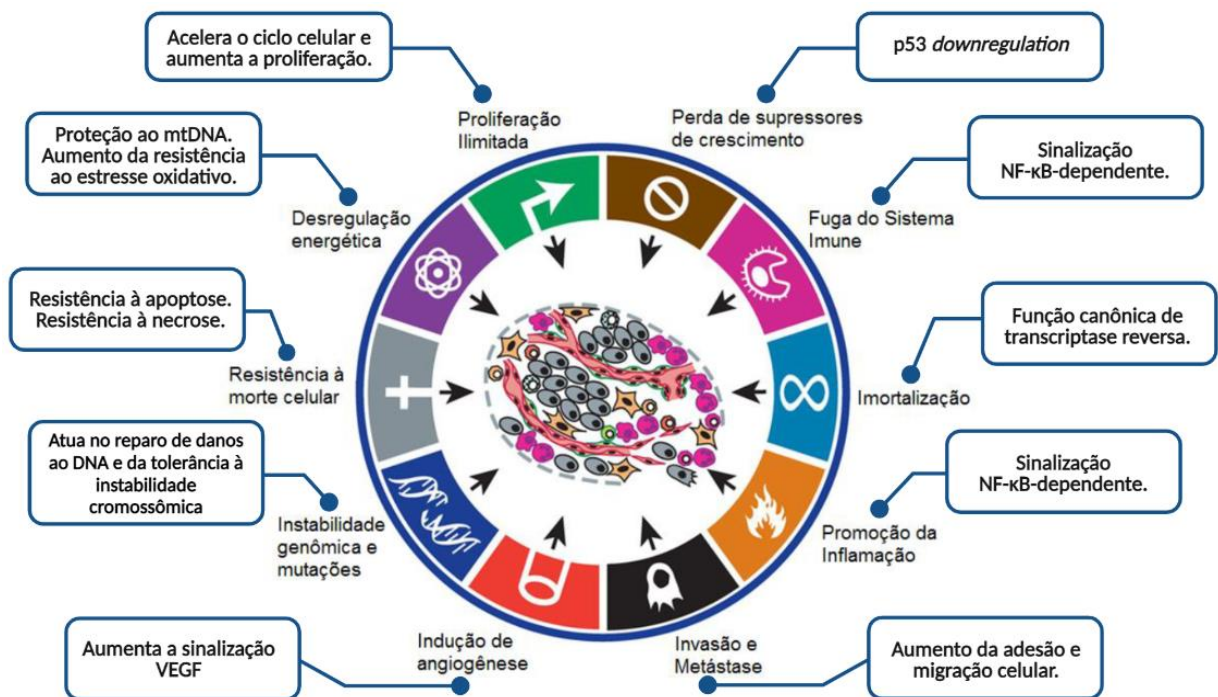
Recentemente, inúmeros estudos demonstraram a importância da atuação da telomerase em outros sítios que não necessariamente estariam relacionados ao alongamento dos telômeros. Existem evidências de que suas multifunções não canônicas extra-teloméricas são muito mais abrangentes do que a sua atuação catalítica nuclear, estando presente e ativa também no citoplasma e nas mitocôndrias (96). Estudos demonstraram que a telomerase pode atuar na carcinogênese e imortalização independentemente da sua função de alongamento dos telômeros (97, 98).

Dentre as inúmeras funções não-canônicas pode-se citar a participação da telomerase na regulação da transcrição heterocromática, modulação da expressão gênica e silenciamento gênico; reparo de danos ao DNA (99, 100); promoção do crescimento e proliferação celular (101); aceleração do ciclo celular (102); regulação do metabolismo e sobrevivência celular; transdução de sinais; manutenção da integridade mitocondrial e resposta ao estresse oxidativo (103); e biologia de células tronco (74, 96).

Todas essas atividades da telomerase estão intrinsecamente relacionadas com as características adquiridas pelas células cancerosas durante o processo de carcinogênese (Figura 7). A expressão de TERT pode promover a tolerância a instabilidade cromossômica, sugerindo que a atuação da telomerase contribua com a promoção, iniciação e progressão do câncer (74). As células cancerosas expressam altos níveis dessa enzima, aproximadamente 99% a mais do que é necessário para a manutenção dos telômeros. O que sugere que a telomerase possua outras funções que conferem vantagem ao crescimento celular. Inúmeros estudos apontam para a relação entre a telomerase e múltiplas atividades celulares que vão além da manutenção do telômero (101-103), especialmente os mecanismos de resposta ao dano no DNA (DDR – DNA *damage response*) (100). Estudos indicam que a expressão de TERT tem íntima relação com os mecanismos de reparo e pode proteger contra citotoxicidade dos danos ao DNA, apoptose e necrose induzida por UV e raios gama (104), além de alterar a dinâmica de interação do telômero com a matriz nuclear, aumentando a eficácia dos mecanismos de reparo (105-107).



A superexpressão de TERT que ocorre em células cancerosas pode ter uma relação direta com os mecanismos de apoptose. Existem estudos que sugerem que TERT está relacionada com a regulação negativa sobre a proteína supressora de tumor p53 (108-110) e que a telomerase interaja com as proteínas da família BCL-2 – MCL-1 e BCL-xl que estão envolvidas na sinalização da via de apoptose (111-114). Em um estudo com células de osteossarcoma, a superexpressão de TERT aumentou a resistência a apoptose (115). Mesmo em células que fazem alongamento alternativo de telômeros a superexpressão de TERT confere mais resistência aos danos ao DNA (116), indicando que a atividade protetora empenhada por TERT não necessariamente está atrelada ao seu papel na manutenção telomérica.



**Figura 7** – Atividades não-canônicas da telomerase e sua relação com as características adquiridas durante a carcinogênese. Adaptado (15, 74).

TERT também pode atuar na transcrição gênica. Há evidências de que pode haver uma relação direta entre a telomerase e o fator NF-κB, que por sua vez, está envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (82, 117-119). TERT promove angiogênese pela interação com genes de VEGF e o fator de transcrição Sp1 (120), e a depender do tipo de célula, pode atuar na promoção

da adesão e migração celular (121, 122). Vários estudos evidenciam a presença de TERT no citoplasma, especialmente nas mitocôndrias (103, 123-125). A telomerase não somente pode ter alguma atuação na mitocôndria, como pode interagir com o DNA mitocondrial de forma positiva e protetora (103, 126, 127).

Alterações na expressão das proteínas *shelterin* também podem atuar na acessibilidade aos telômeros, no remodelamento da cromatina telomérica, promovendo o recrutamento da telomerase e aumentando a instabilidade genômica. Aberrações genômicas desses fatores foram descritos em câncer e podem ter relação com sua formação e progressão, atuando conjuntamente com a telomerase (52, 128, 129).

As observações das atividades não canônicas da telomerase em células cancerosas sugerem que sua atividade não relacionada ao telômero afeta a resistência dessas células aos medicamentos e podem estar relacionadas ao sistema de reparo e dano ao DNA (96, 130). Esses achados corroboram com a hipótese de que a telomerase pode ser um potencial alvo farmacológico e contribuir de forma significativa para a compreensão e desenvolvimento de estratégias contra o câncer.

### 1.3 TERAPÊUTICA ONCOLÓGICA BASEADA NA TELOMERASE

Um dos maiores desafios da terapia anticâncer é o desenvolvimento de drogas específicas para as células cancerosas, sem que as células saudáveis sejam afetadas pelos efeitos deletérios dos fármacos. Visto que ambas são células de um mesmo organismo, com características moleculares em comum. O outro grande desafio é o desenvolvimento de drogas seguras que tenham eficácia terapêutica em todos os tipos de câncer, o que facilitaria a logística do tratamento, reduziria os custos e ampliaria o acesso a terapêutica em uma realidade de serviço público de saúde. Esse último desafio é imposto pela vasta complexidade e heterogeneidade dos tecidos neoplásicos de diversas origens histológicas (25, 48).

As terapias baseadas na telomerase demonstraram-se promissoras pela possibilidade de se ter um alvo farmacológico que é expresso em níveis significativos em células cancerosas e estar presente em mais de 80% dos tipos de câncer (94, 95),

podendo atuar tanto diretamente na sua função catalítica essencial impedindo ou retardando a proliferação celular, quanto nas diversas outras funções não canônicas da telomerase.

Embora existam grupos de células que expressem a telomerase e possam ser afetadas pela sua inibição, como as células tronco, linfócitos ativados, células progenitoras ou células de alta taxa de replicação, ainda assim estudos demonstraram que essas células apresentam telômeros muito mais longos que as células cancerosas (131, 132). Telômeros mais longos recrutam um número maior de proteínas teloméricas, dificultando o acesso da telomerase ao telômero e promovendo a manutenção de um comprimento médio constante por um mecanismo de controle da quantidade de proteínas teloméricas ligadas (70, 133, 134), sugerindo uma janela terapêutica onde pode ser realizada a inibição da telomerase nas células cancerosas sem que os efeitos sejam deletérios nesses grupos específicos de células (25).

A porção RNA - TERC da telomerase é detectada em todas as células humanas, enquanto a expressão da porção TERT (porção catalítica) é restrita a células com atividade mensurável, representando um fator limitante para a atividade enzimática canônica da telomerase (25, 135). A atividade catalítica da telomerase não é expressiva na maioria das células somáticas pela inibição transcricional com consequente silenciamento e inatividade enzimática, o que torna a telomerase um alvo farmacológico interessante do ponto de vista terapêutico, por apresentar atividade catalítica na maioria das células de câncer, mas não na grande maioria dos tecidos saudáveis (25, 41). A importância do controle eficaz da telomerase e do comprimento dos telômeros dentro do contexto de estratégias de terapêutica oncológica tornou-se cada vez mais evidente ao longo dos últimos anos.

Com foco nessas características, na última década foram desenvolvidas inúmeras estratégias terapêuticas que tem como alvo a telomerase, seja de forma direta ou indireta (70). Dentre essas estão as mais diversas tecnologias que incluem a exploração de componentes fitoquímicos e dietéticos (70); inibidores de proteínas quinases ATM (ataxia telangiectasia mutated) e ATR (rad3-related) (136-140); oligonucleotídeos (141-143); uso de microRNAs que influenciam na expressão gênica pós-transcricional (144-146); drogas que modulam a expressão de TRF1 e TRF2 (70, 147); estabilizadores de G-quadruplex (148, 149); as imunoterapias e as pequenas

moléculas inibidoras de telomerase (150, 151) entre outras terapias baseadas no telômero e na telomerase.

As imunoterapias têm como objetivo fazer uso da própria defesa imunológica, estimulando a resposta dos linfócitos. Parte do princípio de que a telomerase degradada nas células de câncer pelos proteossomas tornam-se fragmentos que são potenciais epítomos para as células T do sistema imune que são reconhecidas pelas vias MHC I e II e conseqüente recrutamento de células CD8+ e CD4+. Com uma sensibilização prévia, às células que expressam TERT poderiam ser reconhecidas pelo próprio sistema imune do paciente (150, 152, 153). Os estudos de fase clínica demonstraram o ganho de resposta imune específica, porém sem aumento da sobrevida geral dos pacientes (70).

As drogas BRACO-19, RHPS4 e telomestatina atuam como moléculas ligantes estabilizadoras das estruturas G-quadruplex nos telômeros e modulando assim, o acesso da telomerase (154-158). O composto BRACO-19 em estudo *in vitro* demonstrou inibição à expressão de TERT, indução de senescência, danos ao DNA e ao telômero e parada do ciclo celular em células de câncer de mama e glioblastoma (155, 159). A telomestatina demonstrou inibir a telomerase e ser altamente seletivo para células cancerosas de mama, pâncreas, cervical e de neuroblastomas com efeito mínimo em células normais. Porém, sua baixa solubilidade se tornou um grande dificultador na biodisponibilidade da droga (160, 161). O alcaloide  $\beta$ -carbonílico harmina foi descrito como inibidor de telomerase induzindo senescência celular, inibição da proliferação e da atividade da telomerase (162).

O Imetelstat (13-merthiophosphoramidate oligonucleotide) é um inibidor competitivo da telomerase resistente à nucleases e ácidos que forma uma estrutura estável com o seu antagonista, o molde de RNA funcional, inibindo a atividade da telomerase por competição de sítios, promovendo o encurtamento telomérico, a senescência celular e apoptose (163). Este mecanismo requer um tratamento prolongado o que demonstrou uma alta toxicidade hematológica e hepática. A suspensão promoveu rápida retomada do alongamento telomérico (164). Os resultados de ensaios clínicos de uso prolongado expuseram efeitos colaterais que impuseram obstáculos a sua aplicação clínica (74, 165, 166).

A droga sintética BIBR1532 atua como inibidor competitivo do tipo misto, interferindo no processamento da TERT e dificultando a formação das repetições em

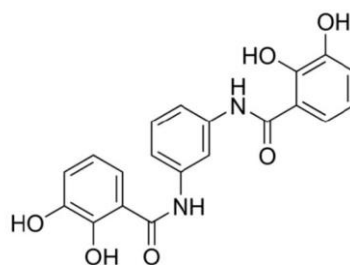
*tandem*, levando ao encurtamento progressivo do telômero. BIBR1532 foi testado como potencializador dos efeitos dos quimioterápicos quando usado em combinação a doxorrubicina, paclitaxel e trióxido de arsênio em câncer de mama e leucemia (167-169).

Recentemente desenvolvida a 6-thio-dG (6-thio-2'deoxygunosina) é uma purina análoga da 6-thioguanina que pode interagir diretamente com a telomerase, ser incorporada nos telômeros e promover a dissociação das proteínas associadas, especialmente as proteínas *shelterin*, promovendo disfunção telomérica e encurtamento do telômero (151, 170, 171).

### **1.3.1 O inibidor de telomerase MST-312**

O MST-312 é um fitoquímico inibidor de telomerase que demonstrou resposta positiva em estudos *in vitro*. Consiste em um análogo sintético derivado das EGCG (epigallocatequina galato), uma catequina do chá verde (Figura 8). Seu análogo natural apresentou capacidade de inibir a telomerase, porém com baixa eficiência, diferentemente do composto sintetizado artificialmente o MST-312 (172).

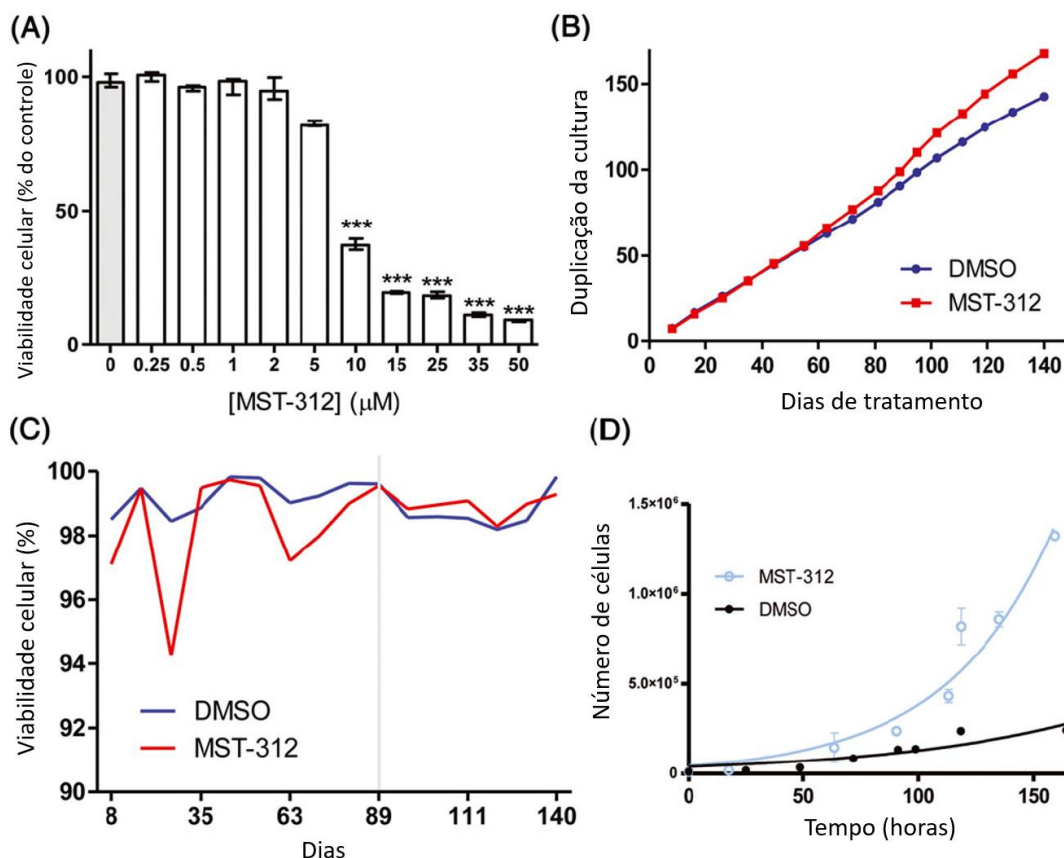
Sua utilização *in vitro* demonstrou efeito inibitório da capacidade proliferativa, redução do comprimento dos telômeros, indução de apoptose (173) e maior eficiência com relação a dose-efeito quando comparado com outros inibidores similares (172). Também levou à inibição da telomerase e parada do ciclo celular em tratamentos de curto prazo e longo prazo (130, 174, 175). Em diversos estudos o MST-312 demonstrou efeitos citotóxicos em tratamentos *in vitro* a partir de 72 horas de incubação em diferentes tipos de câncer. Já foi testado em uso combinado com outros quimioterápicos, apresentando resultados relevantes (176-178).



**Figura 8** – Estrutura química do MST-312. (Acessado em 08/12/2020 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3949?lang=pt&region=BR>).

Em estudo prévio, o inibidor de telomerase MST-312 demonstrou que possui ação citotóxica a curto prazo e a exposição prolongada ao composto promoveu aumento da senescência e aberrações cromossômicas nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (130, 175). Na linhagem MCF-7, como principal efeito à crônica exposição *in vitro* foi observada a superexpressão de telomerase (130). Em células da linhagem MDA-MB-231 o MST-312 apresentou toxicidade a curto prazo e no tratamento prolongado a linhagem respondeu adquirindo um padrão proliferativo distinto da sua linhagem original (Figura 9) com menor tempo de duplicação, sugerindo a aquisição de mecanismos de resistência ao tratamento antitelomerase (175).

Embora as linhagens MCF7 e MDA-MB-231 sejam ambas de câncer de mama, são linhagens com características diferentes, por exemplo, MCF7 tem p53 selvagem enquanto a MDA-MB-231 tem p53 mutada. Assim, para um mesmo alvo farmacológico a resposta pode ser modulada pelas características próprias de cada linhagem. Os resultados prévios, obtidos durante a realização do mestrado, levantaram novas hipóteses que requeriam análises adicionais para compreender o impacto da exposição prolongada ao inibidor de telomerase MST-312 no comportamento da linhagem e na aquisição de mecanismos de resistência.



**Figura 9** – Resultados prévios sobre os efeitos do tratamento de curto e longo prazo na viabilidade celular (**Adaptado de Moraes, et al. 2017**): **A** – Análise da viabilidade celular realizada pelo ensaio de MTT após 72 horas de exposição ao MST-312 em concentrações crescentes em células de MDA-MB-231. Os dados são expressos como mediana com intervalos relativo ao controle negativo. O valor de IC50% de 8,24  $\mu\text{M}$  foi estimado por regressão não linear (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,0001$ , análise por *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn*). **B** – O tratamento de longo prazo com 2  $\mu\text{M}$  de MST-312 demonstrou que após 89 dias de tratamento houve alteração do perfil proliferativo das células tratadas quando comparadas com o controle. **C** – Células coradas com azul de tripan mostraram instabilidade na viabilidade do grupo tratado entre 63 e 89 dias de tratamento. **D** – Tempo de duplicação calculado ao fim do período de exposição, de 32,07 horas para células tratadas (intervalo de confiança de 95% - 27,27-38,93) e 58,34 horas para células do grupo controle (46,19-79,17). (175).

#### 1.4 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

A resistência é uma questão de importância crucial na terapia oncológica. Constitui falha terapêutica, que exige o investimento em terapias com mais efeitos colaterais, e resultando em tratamento por longos períodos. Fenótipos resistentes originam linhagens de câncer com potencial invasivo e metastático de difícil controle,

expressando-se em doença agressiva com redução da sobrevida do paciente, sendo uma das causas mais importantes de insucesso no tratamento (179). É caracterizada pela resistência cruzada a uma ampla variedade de fármacos não relacionados estrutural ou funcionalmente, fenômeno chamado resistência a múltiplas drogas (MDR – *Multidrug Resistance*) (180).

Um dos mecanismos do fenômeno MDR é a superexpressão de um grupo de proteínas de membrana que atuam como bombas de efluxo denominadas transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (179-181). Essas proteínas lançam a droga para fora da célula mantendo uma concentração citotóxica intracelular inferior à concentração necessária para o efeito terapêutico. As proteínas da família ABC possuem domínios ATPase que hidrolisam moléculas de ATP causando efluxo das moléculas hidrofóbicas contra o gradiente de concentração (182). Essas proteínas apresentam estrutura que permite a interação com diferentes classes de moléculas.

As proteínas da família ABC fazem transporte ativo para uma ampla diversidade de substratos como íons, aminoácidos, lipídeos, metabólitos, açúcares, xenobióticos e toxinas, o que configura sua importância fisiológica (181). Além do seu papel transportador, alguns representantes da família ABC também participam de vários mecanismos celulares que impactam na manutenção da homeostase osmótica, processamento de antígenos, divisão celular, regulação do colesterol e transporte de lipídeos (183). Recentes estudos indicam que os transportadores ABC também desempenham papéis além da sua importância no processo de aquisição de resistência. Essas proteínas atuam na regulação da proliferação, diferenciação, migração e invasividade das células cancerosas (181, 184-186). Há evidências de que elas atuem na complexa rede de sinalização e transporte intracelular de moléculas (179) sugerindo alguma interação na carcinogênese.

Os transportadores ABC estão predominantemente presentes na membrana citoplasmática, mas também nas membranas intracelulares do retículo endoplasmático, peroxissomo e mitocôndria (183). Apresentam uma estrutura em dímero, onde cada metade contém um domínio de ligação ao nucleotídeo intracelular (NBDs) responsável pela ligação e hidrólise do ATP e os domínios transmembranares hidrofóbicos (TDMs) que consistem em 6  $\alpha$ -hélices transmembrana. Os NBD são altamente conservados entre os transportadores, ficam localizados na porção citoplasmática e são capazes de fazer a transferência de energia para a realização do



transporte ativo através da membrana. Os TDMs são as porções responsáveis por conferir especificidade aos substratos e interagem com as NBDs por uma hélice de acoplamento por onde é transmitido o movimento molecular. Os NBDs permanecem em uma conformação aberta, mas após a ligação do ATP, eles se aproximam formando a interface completa (183, 187). A hidrólise do ATP interrompe a formação do dímero e libera o ADP e o fosfato inorgânico (183). Em humanos, foram descritos 48 membros da família ABC divididos em sete subfamílias (188) de acordo com seu gene, estrutura, sequência de aminoácidos, organização do domínio e análise filogenética (182).

A subfamília ABCA está muito relacionada ao transporte de lipídeos, e está presente nas doenças como aterosclerose e doença de Alzheimer. A subfamília ABCB tem sua representante mais descrita a ABCB1 (MDR1/ P-glycoprotein/ P-gp), mas, apresenta entre seus integrantes inúmeros transportadores que atuam no transporte nos hepatócitos e fluxo da bile, no sistema imunológico adaptativo, transporte de antígenos, transporte mitocondrial e do ferro. A subfamília ABCC está fortemente ligada ao fenótipo MDR pela proteína ABCC1 (MRP1 - Multidrug Resistance Protein 1), também está relacionada a doenças como a fibrose cística (ABCC7) e síndrome de Dubin-Johnson (ABCC2). A subfamília ABCD está amplamente localizada nos peroxissomos e tem relação com a doença adrenoleucodistrofia (ABCD1). A subfamília ABCG atua no desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas em câncer pela proteína ABCG2 (MXR - mitoxantrone resistance-associated protein/ BCRP - Breast Cancer Resistance Protein), mas os outros integrantes também participam no transporte reverso de colesterol dos macrófagos para o fígado (Tabela 1) (183). Atualmente está consolidada a participação das proteínas P-gp, MRP1 e BCRP na aquisição de fenótipos MDR em células cancerosas.

A glicoproteína G (P-gp) foi identificada em 1976, e desde então é descrita com forte correlação ao fenótipo de resistência a diferentes classes de quimioterápicos (190). O gene da P-gp está localizado no cromossomo 7q21, possui 28 éxons e a proteína possui 1280 aminoácidos com 170 kDa (Figura 10). A P-gp transporta compostos neutros ou hidrofóbicos carregados positivamente e é capaz de extrair uma ampla gama de quimioterápicos. Está presente na membrana apical de células epiteliais, barreiras fisiológicas, tecidos excretórios, barreira hematoencefálica e nos

tratos gastrointestinal, fígado e rim e desempenha papel fundamental na farmacocinética dos medicamentos (181).

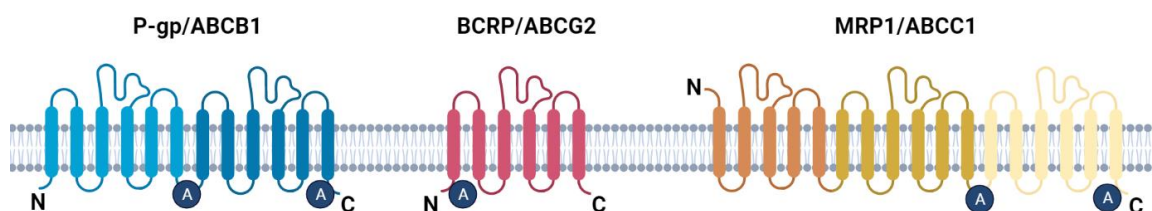
A proteína MRP1 foi descrita como promotor de resistência em células de câncer de pulmão, selecionadas por exposição a quimioterápico (191). O MRP1 humano contém 1531 aminoácidos com 2 NBDs e 3 TMDs e é amplamente expresso em vários tecidos do corpo (Figura 10). Existe uma confluência considerável de moléculas que são substratos dessa proteína, quando comparada com a P-gp. A MRP1 eflui moléculas hidrofóbicas e principalmente conjugados de ânions orgânicos anfipáticos e pode ser dependente da glutatona para alguns compostos hidrofóbicos (192, 193). Esta fisiologicamente presente na barreira hemato-testicular, no epitélio oral e em túbulos coletores nos rins.

O transportador ABCG2 foi identificado e descrito como mediador da resistência em câncer de mama em células altamente resistentes a doxorrubicina (194). A BCRP está expressa na placenta, onde desempenha papel vital na troca de nutrientes entre a mãe e o feto, no fígado, rim, trato gastrointestinal, células-tronco hematopoiéticas e barreira hemato-encefálica (195) e faz o efluxo de ânions orgânicos e moléculas sem carga. Já foi descrita em leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda e câncer de pulmão (181). Pertence ao grupo de transportador homodímero, com apenas um NBD e TMD (Figura 10).

**Tabela 1** – Principais proteínas de transporte ABC envolvidas nos mecanismos de resistência a múltiplas drogas: Locais de expressão fisiológica e substratos mais importantes. Adaptado (183).

Transportador	Localização	Substratos
<b>P-gp (ABCB1)</b>	Intestino, rim, adrenal, fígado, testículos, placenta, barreira hematoencefálica, hematopoiética e células-tronco.	Antraciclina, taxanos, compostos orgânicos neutros e catiônicos, digoxina, inibidores de tirosina quinase.
<b>BCRP (ABCG2)</b>	Intestino, rim, placenta, fígado, barreira hematoencefálica, mama e células-tronco.	Antraciclina, agentes alquilantes, análogos derivados de camptotecina, feoforbídeo A, ácido úrico, flavopiridol, inibidores de tirosina quinase.
<b>MRP1 (ABCC1)</b>	Superfície basolateral das células do epitélio.	Antraciclina, epipodofilotoxinas, LTC4, metotrexato, GS-X e outros conjugados e ânions orgânicos.

Extensos estudos tentam esclarecer os mecanismos genéticos e epigenéticos, a bioquímica e os fatores intrínsecos do processo de resistência, que, didaticamente, pode ser classificada em resistência intrínseca e resistência adquirida (196, 197). A resistência intrínseca diz respeito ao acúmulo de mutações genéticas dado pela alta taxa de proliferação e instabilidade genômica somada a alterações epigenéticas. A resistência adquirida ocorre pela exposição à agentes estressores, como as drogas quimioterápicas. Esse tipo de resistência tem relação com a absorção, metabolização e excreção dessas drogas e como a célula reage frente a esse agente estressor (198). O microambiente tumoral também desempenha papel de proteção aos agentes citotóxicos, contribuindo no processo de aquisição de resistência (179, 184).

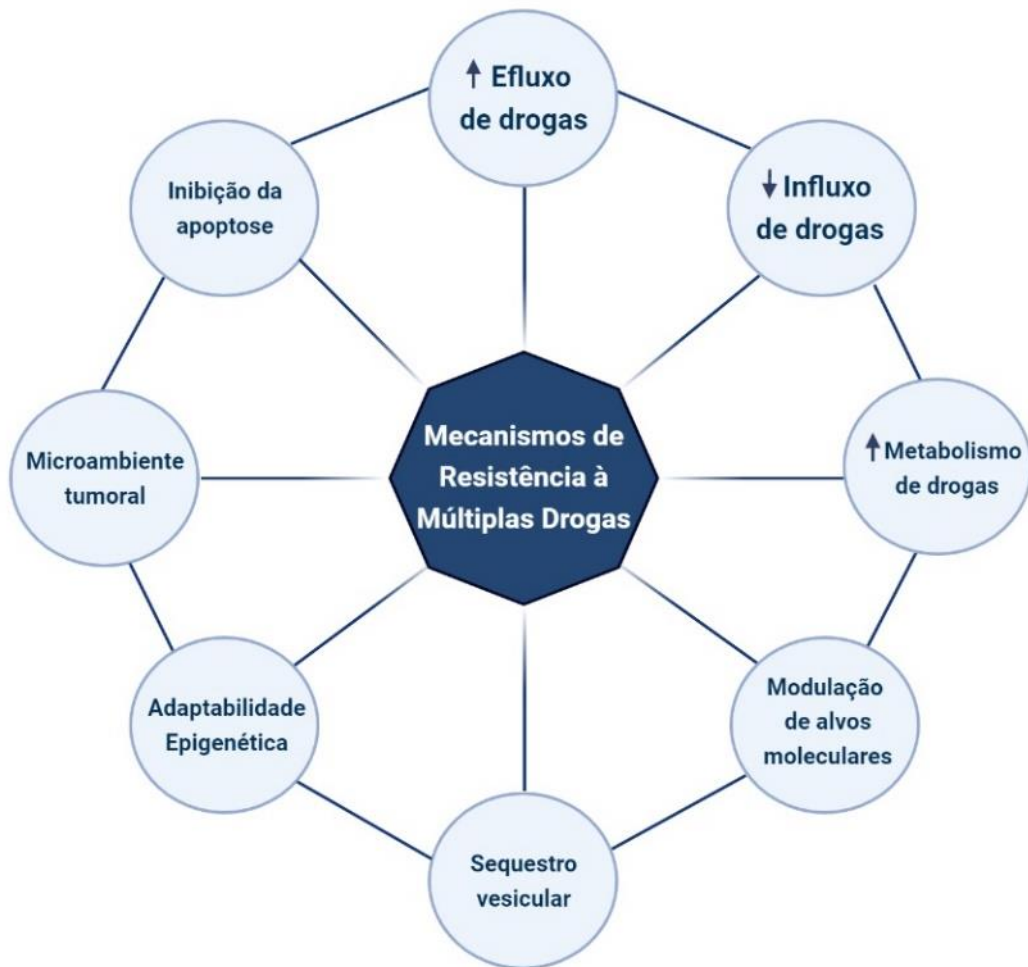


**Figura 10** – Representação esquemática da estrutura e domínios das proteínas de transporte ABC: P-gp, BCRP e MRP1. P-gp contém 2 domínios transmembrana, 6  $\alpha$ -hélices e 2 sítios NBD. BCRP possui 1 domínio transmembrana, 6  $\alpha$ -hélices e 1 sítio NBD. MRP1 tem 2 domínios transmembrana com 6  $\alpha$ -hélices, 1 domínio transmembrana com 5  $\alpha$ -hélices e 2 sítios ATP-binding (C, terminal carboxila; N, terminal amino; A, domínio de ligação de nucleotídeo). Adaptado (187).

O desenvolvimento desses fenótipos perpassa por mecanismos multifatoriais que conferem à célula a capacidade de evasão ao tratamento. Esses mecanismos sofrem interferência de fatores intratumorais e fatores associados ao indivíduo (187, 199). Como fatores do indivíduo podem-se citar as variações genéticas, principalmente em genes que codificam as enzimas de metabolização, absorção e efluxo das drogas, responsáveis pelos mecanismos de reparo e controle do ciclo celular e alelos relacionados ao sistema imune. Outros fatores que interagem com o genótipo estão relacionados a idade, a presença de comorbidades, a dieta e as interações medicamentosas (199, 200).

Os fatores relacionados ao tumor que contribuem para a quimioresistência incluem alterações moleculares genéticas e epigenéticas (Figura 11) (201) como a superexpressão de proteínas transportadoras, inibição aos transportadores de influxo, alterações de membrana, sequestro dos fármacos em vesículas e compartimentos

intracelulares (202), alterações epigenéticas como moduladores da expressão de genes envolvidos nos mecanismos de apoptose e reparo; aumento do metabolismo; regulação dos *checkpoints* do ciclo celular; alteração na sinalização celular; desregulação de microRNAs; plasticidade das células-tronco cancerosas e heterogeneidade intratumoral (187). A resistência torna-se uma questão ainda mais relevante pois as células potencialmente resistentes, principalmente por tratamento prévio com um determinado fármaco, adquirem essa capacidade com relação a outros medicamentos, mesmo aos quais ainda não houve exposição prévia (203).



**Figura 11** – Mecanismos multifatoriais envolvidos na aquisição de fenótipo MDR. Adaptado (216).

## 2 JUSTIFICATIVA DESTE ESTUDO

Os estudos apontam que a telomerase é um alvo sensível, no entanto o longo período de exposição aos inibidores de telomerase exigido para o encurtamento do telômero levanta a questão da toxicidade e da possibilidade de desenvolvimento de resistência. A heterogeneidade intratumoral das células cancerosas interpõe-se como um desafio para o estabelecimento de terapias que sejam resolutivas. Estudos que demonstram a aptidão celular para desenvolver mecanismos de sobrevivência frente à exposição prolongada aos inibidores de telomerase sugerem a complexidade das estratégias de tratamento baseada na telomerase (39, 70, 151).

Em muitos estudos, não somente o MST-312, mas vários inibidores foram testados em associação com outros quimioterápicos (141, 168, 169, 204, 205) como estratégia para evitar a elevada toxicidade e os mecanismos de resistência ocasionados pelo uso prolongado. O uso combinado se beneficia da ação imediata dos inibidores no telômero e na telomerase, atuando em inúmeras vias alternativas que causam instabilidade celular. A telomerase pode ter influência direta ou indiretamente sobre as vias que conferem todas as características do câncer, e o uso de inibidores pode interferir também nessas funções. Entender como esses elementos interagem e obter informações sobre os mecanismos de resistência a esses medicamentos pode dar respaldo a segurança no uso dessas drogas.

### **3 HIPÓTESE DESTE ESTUDO**

A exposição prévia ao inibidor de telomerase MST-312 pode sensibilizar as células de câncer de mama MDA-MB-231 à ação de quimioterápicos.

A inibição farmacológica da telomerase não implica em desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas,

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar o potencial terapêutico *in vitro* da inibição da telomerase a longo prazo em células de câncer de mama, avaliando o efeito dessa inibição na ação de quimioterápicos.

Para efeito desse estudo, foi considerado longo prazo de exposição período de pelo menos 8 semanas, uma vez que a maioria dos estudos com inibidores de telomerase *in vitro* limitam as análises a poucos dias.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito citotóxico do MST-312 em culturas monoclonais de células MDA-MB-231.
- Avaliar o efeito sinérgico do MST-312 em associação com quimioterápico em exposição de curto prazo em células MDA-MB-231.
- Avaliar o efeito sensibilizador da exposição prévia ao MST-312 por longo período na atuação de quimioterápico em células MDA-MB-231.
- Avaliar o efeito citotóxico do inibidor de telomerase MST-312 em cultura celular 2D e 3D em células MDA-MB-231.
- Avaliar a aquisição de resistência a múltiplas drogas e alterações morfológicas em células MDA-MB-231 previamente submetidas à exposição prolongada ao inibidor de telomerase MST-312.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 SUMÁRIO METODOLÓGICO

Em estudos prévios, demonstramos que o MST-312 apresentou citotoxicidade mesmo quando utilizado a curto prazo e que o uso prolongado do inibidor de telomerase em células de câncer de mama foi capaz de promover pressão seletiva de células com características distintas da linhagem original (130,175). Os ensaios do atual estudo tiveram como objetivo complementar as análises previamente realizadas em células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 (Figura 12). As células tratadas por 180 dias nos grupos D (controle tratado com DMSO – dimetilsulfóxido - que é o veículo do inibidor MST-312) e M (tratado com MST-312), foram submetidas a ensaio de qPCR para a mensuração do tamanho do telômero após exposição prolongada.

Com o objetivo de avaliar o impacto da heterogeneidade celular na resposta ao inibidor de telomerase, foi realizada seleção clonal de células MDA-MB-231, estabelecimento de cultura monoclonal dessa linhagem, com posterior tratamento dessas células em dois grupos: D (controle tratado com DMSO) e M (tratado com MST-312) e avaliação do perfil proliferativo das culturas monoclonais.

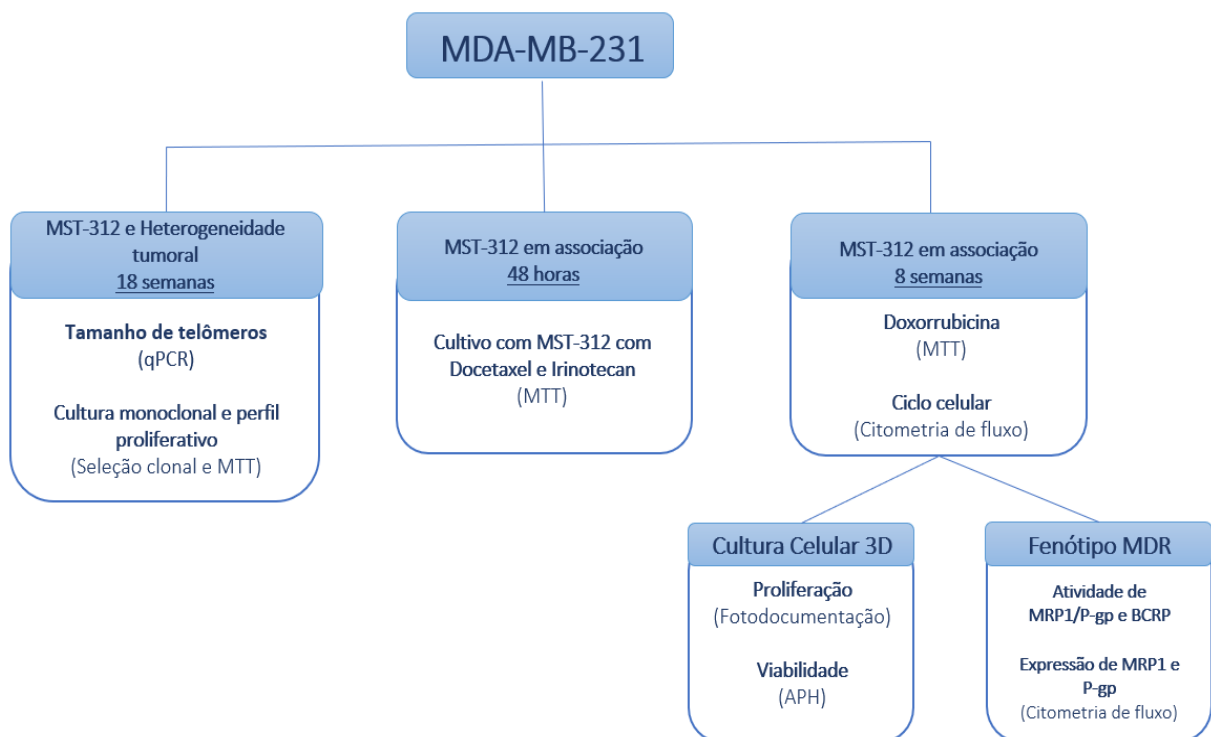
Para avaliar a ação sensibilizante do inibidor MST-312 a curto prazo, células MDA-MB-231 foram tratadas em associação com os quimioterápicos Docetaxel e Irinotecan em diferentes concentrações por 48 horas em dois grupos: D (controle tratado com DMSO e quimioterápico) e grupo M (tratado com MST-312 e quimioterápico) e analisadas pelo método de MTT.

Para avaliar a ação sensibilizante do inibidor MST-312 a longo prazo, células da linhagem MDA-MB-231 foram divididas nos grupos D (tratado com DMSO), grupo M (tratado com MST-312) e grupo P (sem tratamento) e cultivadas nas mesmas condições. O cultivo foi realizado por 8 semanas (56 dias no mínimo), tempo suficiente para observar os efeitos citotóxicos do MST-312, mas não para que houvesse erosão telomérica. Posteriormente, os grupos foram avaliados quanto à resposta ao quimioterápico doxorrubicina em diferentes concentrações pelo método de MTT,



quanto à morfologia em micrografias por microscópio de contraste de fase e quanto ao ciclo celular por citometria de fluxo.

Para avaliar os efeitos do tratamento prolongado com inibidor e a sensibilidade a doxorrubicina em modelo tridimensional pela técnica de cultura celular 3D, foram confeccionados esferoides de células MDA-MB-231 (previamente tratadas por 8 semanas nos grupos D, M e P). Os esferoides foram avaliados quanto à viabilidade pelo método de APH e quanto à proliferação pela mensuração do volume das estruturas tridimensionais. Para avaliar a aquisição de fenótipo de resistência a múltiplas drogas as células MDA-MB-231 (previamente tratadas por 8 semanas nos grupos D, M e P) foram analisadas quanto a atividade e expressão de proteínas de transporte da família ABC, especificamente P-gp, MRP1 e BCRP por citometria de fluxo.



**Figura 12** – Desenho experimental do projeto: Respective métodos utilizados em cada ensaio para o estudo da atividade terapêutica do MST-312 em células de câncer de mama MDA-MB-231.

## 5.2 DETALHAMENTO DAS TÉCNICAS

### 5.2.1 Cultura celular 2D

A cultura celular 2D consiste no cultivo das células em monocamada. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's médium* - Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As trocas de meio ocorriam a cada 2 ou 3 dias. Todas as células foram mantidas na estufa umidificada com CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37° C. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem a confluência de aproximadamente 80%, eram tripsinizadas (exposição a protease para clivar as proteínas de adesão na superfície da placa) e transferidas para nova placa. O acompanhamento da morfologia das culturas foi realizado por meio de microscópio de contraste de fase

### 5.2.2 Tratamento com MST-312

As células foram divididas nos seguintes grupos: grupo controle, denominado D, que foram tratados com DMSO a 0,01% que é o veículo do MST-312; grupo teste, denominado M, que foram tratados com MST-312 em uma concentração de 2 µM diluído em DMSO a 0,01%; e grupo controle, denominado P que foi cultivado nas mesmas condições dos grupos teste e controle, porém com meio sem tratamento, cultivada apenas com meio suplementado. As células permaneceram expostas continuamente aos respectivos tratamentos por todo o período do estudo. A cada passagem que ocorria a cada 2 a 3 dias, 20.000 células viáveis eram transferidas para nova placa de 10 cm após contagem com azul de tripan.

### 5.2.3 Análise do tamanho relativo dos telômeros por PCR em tempo real

Células de MDA-MB-231 foram previamente tratadas por 180 dias. Posteriormente, para mensurar o tamanho relativo dos telômeros foi realizada a extração de DNA genômico: as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato) e em seguida, foi adicionada solução de lise (2% SDS), seguida de tampão contendo 20 mmol/L de EDTA e 50 mmol/L de Tris. O DNA foi precipitado com 5 mol/L de cloreto de sódio e etanol. O DNA foi quantificado por nanoespectrofotômetro.

A quantificação relativa do conteúdo dos telômeros nas amostras de DNA foi realizada por PCR em tempo real. Cada 25 µl de reação qPCR continha Taq DNA polimerase (0,75U) em 1x tampão Taq, 0,2 mmol/L cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1,5 mmol/L MgCl; 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, *EvaGreen* (Biotium, Fremont, CA, EUA) 1x, 10 mmol/L de ditiotreitól; 0,5 ml de DMSO; 5 ml de DNA *template* e conjuntos de primer.

Duas reações foram realizadas: telômero e um gene de cópia única (SCG) 36B4 (parâmetro de referência). As concentrações finais do primer foram as seguintes:

- Telômero *forward* 0,3 mmol/L e *reverse* 0,4 mmol/L;
- 36B4: *forward* 0,3 mmol/L e *reverse* 0,5 mmol/L.

As sequências de primer foram as mesmas descritas por Lau *et al.*:

- Telômero *forward* GGTTTTTGGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT e *reverse* TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA;
- 36B4 *forward* CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC e *reverse* CCATTCTATCATCAACGGGTACAA.

As condições de PCR foram as seguintes:

- Telômero: 95°C por 15 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 54°C por 30s e 72°C por 2 min;
- 36B4: 95°C por 15 min, 35 ciclos de 95°C 15 s, 58°C durante 30s e 72°C durante 1 min.
- Para análise de dados, adotou-se a metodologia conhecida como delta-delta-Ct, que baseia-se na diferença entre o Ct do produto de interesse (telômeros) e do

padrão interno (SGC - 36B4) em relação à mesma diferença calculada para uma amostra referência (padrão externo – linhagem original não tratada), permitindo a quantificação relativa corrigida do material amplificado (130).

#### **5.2.4 Seleção Clonal**

As células MDA-MB-231 foram cultivadas com meio DMEM em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, foram tripsinizadas e ressuspensas a uma concentração de 50 células/mL. Em placa de 96 poços foram lançados 200 µL dessa diluição em cada poço da placa. Após 2 horas, foi realizado uma leitura da placa por microscopia de contraste de fase para identificar os poços que possuíam uma única célula. Esses poços foram submetidos a leitura em 5, 12 e 24 horas após o plaqueamento e depois diariamente, para acompanhamento das linhagens monoclonais até que alcançassem confluência, quando foram tripsinizadas, amplificadas em placas de 10 cm de diâmetro, submetidas à análise morfológica, de cariótipo e tederminação de tempo de duplicação, e congeladas para realização de experimentos. Para esse estudo, foi selecionada a linhagem clonal (F9) que apresentou cariótipo homogêneo e perfil proliferativo semelhante a linhagem celular original.

#### **5.2.5 Cariotipagem**

As células MDA-MB-231 foram cultivadas com meio DMEM em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, foram tripsinizadas e ressemeadas 300.000 células em placas de 3,5 cm de diâmetro por 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com colchicina 0,05% por 2 horas (70 µL a cada mL de meio de cultivo). As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 3 mL de tampão hipotônico de KCl (0,075 M) e incubadas a 37° C por 40 minutos em ambiente úmido com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram centrifugadas (6 minutos a

velocidade de 1.000 rpm), descartado o sobrenadante e ressuspensas novamente em 500  $\mu$ L de fixador (metanol/ ácido acético 3/1 v/v) e centrifugadas novamente (6 minutos a velocidade de 4.000 rpm). Ao final o sobrenadante foi desprezado e adicionado 500  $\mu$ L de fixador sem ressuspensão e submetidas a nova centrifugação (6 minutos a velocidade de 4.000 rpm). As células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de fixador.

As lâminas foram tratadas com álcool absoluto em imersão por 30 minutos e posteriormente lavadas com detergente líquidos e após lavadas foram imersas em água ultrapura por 5 minutos e secas com papel toalha. Uma gota da suspensão das células foi colocada em lâmina preparada previamente e coradas com corante Giemsa 5% por 5 minutos. As amostras foram digitalizadas com *scanner ScanscopeCS Aperio*. As imagens aumentadas 20 vezes foram analisadas com o *software ImageScope*.

#### **5.2.6 Análise de atividade mitocondrial por ensaio de MTT**

As células foram semeadas em placa de 96 poços (10.000 células por poço) com grupos de 8 poços para cada concentração testada. Constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com os veículos. A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT após o período de tratamento. O meio de cultura foi trocado e o MTT dissolvido em tampão fosfato, colocado em cada poço (1 mg/ml).

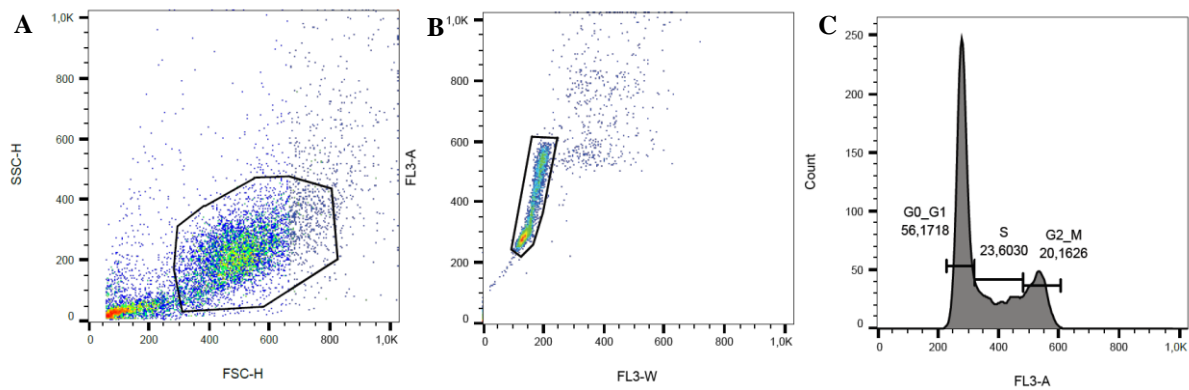
Após duas horas de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos por adição de 100  $\mu$ L de dodecil-sulfato de sódio a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v). Os valores de absorbância foram extraídos a partir de espectrofotometria utilizando um leitor de microplacas em um comprimento de onda de 630 nm e submetidos à análise estatística. Os dados foram expressos relativamente como percentual do grupo controle sem tratamento cuja mediana correspondeu a 100% de viabilidade.

### 5.2.7 Tempo de duplicação

O tempo de duplicação foi estimado como tempo em horas para duplicar a quantidade de células em cultura. As células foram cultivadas em placas de 96 poços em condições de subconfluência (1000 células/poço) e mantidas na estufa umidificada com CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37° C por 1 semana com troca de meio a cada 3 dias. A celularidade foi aferida em intervalos regulares em grupos de 8 poços por meio do ensaio de MTT após validação da atividade metabólica como parâmetro de celularidade em comparação à contagem direta ao microscópio. O uso do MTT demonstrou maior robustez à análise estatística por gerar dados com menor variância que aqueles provenientes do uso de corantes intracelulares tradicionais. Os dados de absorbância relativa foram plotados em um gráfico e ajustados a uma regressão não linear com equação exponencial para estimar o tempo de duplicação.

### 5.2.8 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

As células previamente cultivadas por 8 semanas foram fixadas com etanol 70% em quantidade de  $1 \times 10^6$  células e após 2 lavagens com PBS foram incubadas por 30 minutos em banho maria a 37°C com uma solução de ciclo celular – citrato de sódio 4 mM, Iodeto de Propídeo - PI (50 µg/mL), Triton x-100 0,3% e RNase (100 µg/mL) e analisadas no citômetro de fluxo. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por amostra e a distribuição das células nas fases G0/G1, S e G2/M foi analisada pelo *software Summit v 4.3*. As células de interesse foram selecionadas (*gate*) de acordo com a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do laser, que podem ser utilizados como uma estimativa aproximada do tamanho e granulosidade. Artefatos foram, desta forma, eliminados. As células selecionadas foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo integrado ao DNA. O percentual de células em cada fase do ciclo foi representado em histogramas (Figura 12).



**Figura 13** – Seleção de células por *gating*: **A** - O eixo Y se refere a dispersão lateral do laser SSC (*side scatter*), enquanto o eixo X se refere a dispersão frontal do laser FSC (*forward scatter*). A seleção permite deixar a amostra mais homogênea e livre de partículas que não fazem parte da população das células. **B** – Gráfico referente ao canal FL3 onde o eixo Y se refere a área e o eixo X se refere a largura do comprimento de onda da fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo. Essa seleção elimina da amostra agregados celulares ou *doublets*. **C** – Representação em histograma das células em suas respectivas fases do ciclo celular.

### 5.2.9 Cultura celular 3D

A cultura celular 3D é uma metodologia na qual as células podem crescer e interagir em todas as dimensões em um microambiente artificial que proporcione a formação de um agregado celular compacto. Esse método permite a avaliação da interação das células entre si e com o microambiente, mimetizando o que ocorre *in vivo*. Para o ensaio de cultura celular 3D as células foram semeadas em placa de 96 poços (5.000 células por poço) sobre um arcabouço de agarose (1%) e foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium - Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina. Todas as células foram mantidas na estufa umidificada com CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37° C. As células foram divididas em três grupos, o grupo P (sem tratamento, cultivada apenas com meio suplementado), grupo controle (D - tratadas apenas com DMSO a 0,01% - veículo do MST-312) e o grupo teste (M - tratadas com MST-312 a 2 µM e DMSO a 0,01%) onde permaneceram em tratamento por 4 dias para a formação do esferoide compacto.

### **5.2.10 Análise de viabilidade metabólica por ensaio de APH**

O ensaio de APH consiste na transformação de p-nitrofenil fosfato (PNPP) em p-nitrofenol. Após a formação do esferoide compacto, estes foram transferidos para uma placa sem o arcabouço de agarose; os esferoides foram centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm, descartado o sobrenadante e lavados com PBS 2 vezes. Foi adicionado 100 µl de solução tampão com substrato de reação PNPP 2 mg/ml ao poço com o esferoide. As placas foram incubadas por 90 minutos em estufa e protegidas da luz. Foi adicionado a cada poço 10 µl de NaOH (1M). A mensuração da densidade óptica foi obtida a 405 nm por espectrofotômetro (*Multiskan spectrum UV/visible*).

### **5.2.11 Análise morfométrica em cultura celular 3D**

Ao final do cultivo, os esferoides foram analisados por microscopia de contraste de fase através de fotodocumentação com máquina fotográfica digital acoplada ao microscópio e conectada a um computador. Cada esferoide, representando sua respectiva condição de cultivo foi fotografado e teve seu volume estimado através da seleção e análise da área total dos esferoides no seu maior eixo e determinadas através do *software ImageJ*. Imagens foram coletadas de todos os esferoides formados em todas as condições.

### **5.2.12 Avaliação de atividade das ATPases por citometria de fluxo**

Para avaliar a atividade das proteínas MRP1 e P-gp as células foram incubadas em estufa úmida 5% CO<sub>2</sub> a 37°C em 3 condições por 45 minutos: meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB; meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB adicionando-se o fluorocromo Rodamina 200 ng/mL (substrato da ATPase MRP1 - proteína associada a resistência a múltiplas drogas); meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB, adicionando-se Rodamina



200 ng/mL e o modulador Ciclosporina A 200 ng/mL. Foi adicionado PBS pH 7,4 a 5°C e foi realizado a centrifugação, desprezando o sobrenadante. Foi adicionado às células meio RPMI com ou sem ciclosporina, onde ficaram incubadas por mais 45 minutos. Um mínimo de 10.000 eventos por amostra foram adquiridos em citômetro de fluxo e os dados foram analisados pelo *software Summit v 4.3*.

Para avaliar a atividade dos transportadores BCRP, as células foram incubadas em estufa úmida 5% CO<sub>2</sub> a 37°C em 3 condições por 30 minutos: meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB; meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB adicionando-se o fluorocromo *Pheophorbide A - PhA* 1 µM (substrato específico para proteína relacionada ao câncer de mama - BCRP); meio RPMI (Gibco) com 10% de SFB, adicionando-se *Pheophorbide A - PhA* 200 ng/mL e o modulador Fumitremorgin C - FTC 10 µM. Ao final da incubação foi adicionado PBS pH 7,4 a 5°C e foram centrifugadas. Desprezado o sobrenadante, foi adicionado às células meio RPMI com ou sem FTC, onde ficaram incubadas por mais 30 minutos. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por amostra em citômetro de fluxo e os dados foram analisados pelo *software Summit v 4.3*.

A aquisição foi feita utilizando-se os canais FL-2 (585nm) e FL-4 (615nm). Foram consideradas positivas para atividade de extrusão as amostras que apresentarem a Razão da Média de Intensidade de Fluorescência (RIF)  $\geq 1,1$ , em que  $RIF = \text{Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) do tubo com modulador} / \text{MIF do tubo sem modulador}$ .

### **5.2.13 Avaliação da expressão de MRP1 e P-gp por citometria de fluxo**

O ensaio de detecção das bombas de efluxo foi realizado em citômetro de fluxo com anticorpo monoclonal conjugado a fluoresceína. Para o ensaio de expressão de P-gp, tubos com  $0,5 \times 10^6$  células foram centrifugadas por 5 minutos e descartado o sobrenadante, foi adicionado solução de PBS e SFB a 2% para bloqueio de ligações inespecíficas. As células foram incubadas nesta solução por 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova centrifugação, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com anticorpo em ausência de luz por 30 minutos

em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas com PBS e o sobrenadante foi descartado, o procedimento foi repetido duas vezes. Foi realizada a aquisição em citômetro de fluxo.

Para a análise de expressão de MRP1 as células foram distribuídas a  $0,5 \times 10^6$  células/tubo, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Foi adicionado o fixador de polietilenoglicol e formol, onde ficaram incubadas por 30 minutos. Foi adicionado PBS *tween* 0,5% e incubadas por 30 minutos para permeabilizar as membranas, visto que o MRP1 é um epítopo intracelular. As células foram centrifugadas novamente e foi adicionado PBS com SFB 2% para bloqueio de ligações inespecíficas, onde permaneceram 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova centrifugação as células foram incubadas com anticorpo. Foi adicionado PBS com *tween* 0,5% e realizada a aquisição em citômetro de fluxo.

Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por amostra; a leitura foi feita utilizando-se o canal FL-1 (530nm) e os dados foram analisados pelo *software Summit v 4.3*. As células de interesse foram selecionadas (*gate*) de acordo com a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do laser, que podem ser utilizados como uma estimativa aproximada do tamanho e granulosidade. Artefatos foram, desta forma, eliminados. Foram consideradas positivas para a expressão as amostras que apresentaram a Razão da Média de Intensidade de Fluorescência  $\geq 1,1$ , em que RIF = Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) do tubo com imunomarcacão / MIF do tubo sem imunomarcacão.

#### **5.2.14 Análise estatística**

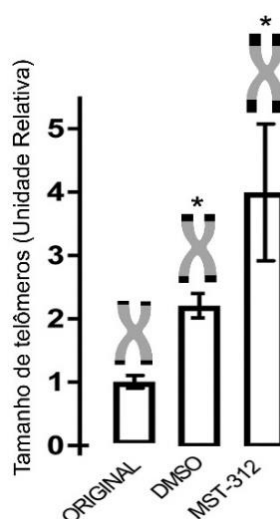
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism7 (Windows)*. A escolha da medida de tendência central e medidas de dispersão foram feitas de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. Os testes utilizados foram os não paramétricos de *Mann-Whitney* para análise binária ou de *Kruskal-Wallis* (seguido do teste de *Dunn*) para múltipla comparação. Os Valores de P estatisticamente significativos nas análises foram inferiores 0,05. O teste utilizado para cada análise foi especificado na apresentação dos resultados.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 MST-312 E HETEROGENEIDADE TUMORAL

#### 6.1.1 Avaliação do Tamanho dos Telômeros

Considerando os resultados obtidos em estudo prévio (175, 206) acerca do perfil de resposta da linhagem MDA-MB-231 à exposição à longo prazo ao MST-312, que sugeriram pressão seletiva imposta pelo tratamento, avaliou-se o efeito da exposição prolongada ao MST-312 no comprimento dos telômeros das células da linhagem MDA-MB-231. Após a exposição prolongada de 180 dias ao inibidor de telomerase MST-312 a 2  $\mu$ M (concentração subtóxica, a menor dentre as testadas para a qual não foi observada citotoxicidade - IC50% de 8,24  $\mu$ M - 175), foi realizado ensaio de qPCR para mensurar o tamanho relativo dos telômeros das linhagens (Figura 13).

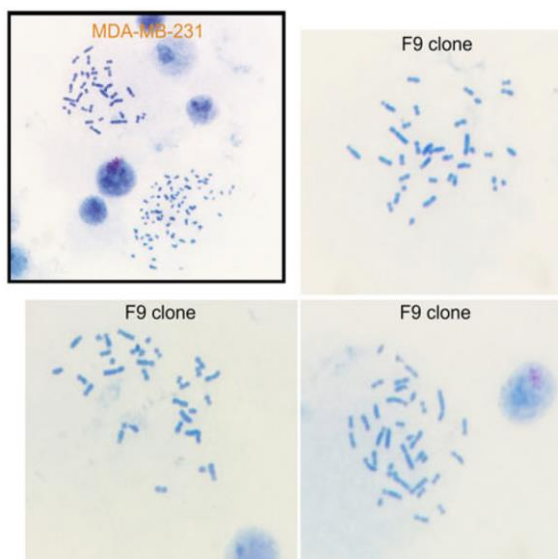


**Figura 14** – Tamanho relativo de telômeros por ensaio de qPCR em células da linhagem MDA-231 após 180 dias de tratamento com MST-312: Ocorreu aumento dos comprimentos medianos dos telômeros no grupo tratado em relação à linhagem original. Análise estatística dos dados foi realizada por teste de *Kruskal-Wallis* e pós teste *Dunn* (\*= $p < 0,05$ ).

Foi observado um aumento significativo no tamanho dos telômeros comparado a linhagem original no grupo DMSO e no grupo tratado com MST-312 ( $p < 0,05$ ), o que pode sugerir a seleção de clones com essas características durante a exposição prolongada, que é um fenômeno possível em vista da grande heterogeneidade de células tumorais que compõem a linhagem. De fato, mesmo a exposição apenas ao DMSO já demonstra essa diferença, que é mais clara no grupo tratado com o inibidor, levando à hipótese de que a aquisição de telômeros maiores pela linhagem decorre de pressão seletiva.

### **6.1.2 Influência da heterogeneidade celular no efeito do MST-312**

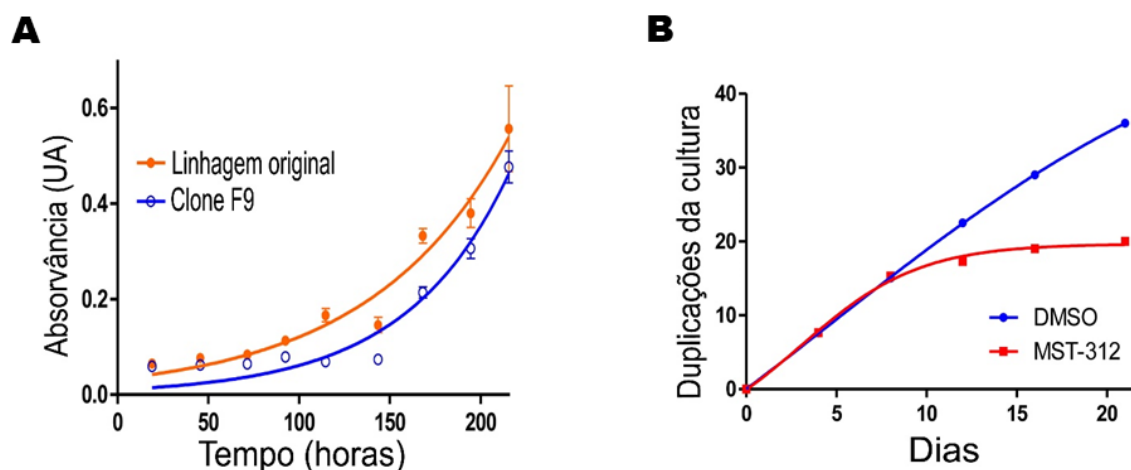
Para avaliar o impacto da heterogeneidade na resposta ao MST-312, foi realizado um ensaio de seleção clonal na linhagem MDA-MB-231, com o objetivo de testar a hipótese de que o aumento no tamanho dos telômeros havia ocorrido em função da seleção de células com tais características. Células da linhagem MDA-MB-231 que não foram expostas ao MST-312 foram submetidas à distribuição em placas de 96 poços, conforme descrito no subitem 5.2.3, de modo a gerar culturas clonogênicas. O método de cultura monoclonal permite selecionar dentro da mesma linhagem, culturas com características fenotípicas e comportamento homogêneo, reduzindo os impactos da heterogeneidade celular. As linhagens monoclonais foram produzidas e o clone F9 foi selecionado por ter apresentado maior homogeneidade de cariótipo (Figura 14).



**Figura 15** – Micrografia de cariótipos da linhagem MDA-231 após seleção clonal: Na linhagem original (em destaque) é possível observar a variabilidade entre os cariótipos, enquanto no clone é possível observar um padrão homogêneo na apresentação dos cariótipos de MDA-MB-231. Imagens obtidas com *scanner ScanscopeCS Aperio* aumentadas 20 vezes e analisadas com o *software ImageScope*.

### 6.1.3 Perfil proliferativo da cultura monoclonal

Após a seleção clonal foi realizada a comparação entre o padrão de comportamento proliferativo do clone e da linhagem original (Figura 15-A), demonstrando que há semelhança entre a linhagem original e a linhagem clonal quando observado o tempo de duplicação. Após a exposição da linhagem monoclonal ao inibidor de telomerase MST-312 foi possível observar uma inibição quase completa do crescimento da cultura após 10 dias (Figura 15-B), contrastando com o comportamento previamente descrito (Figura 9-B).

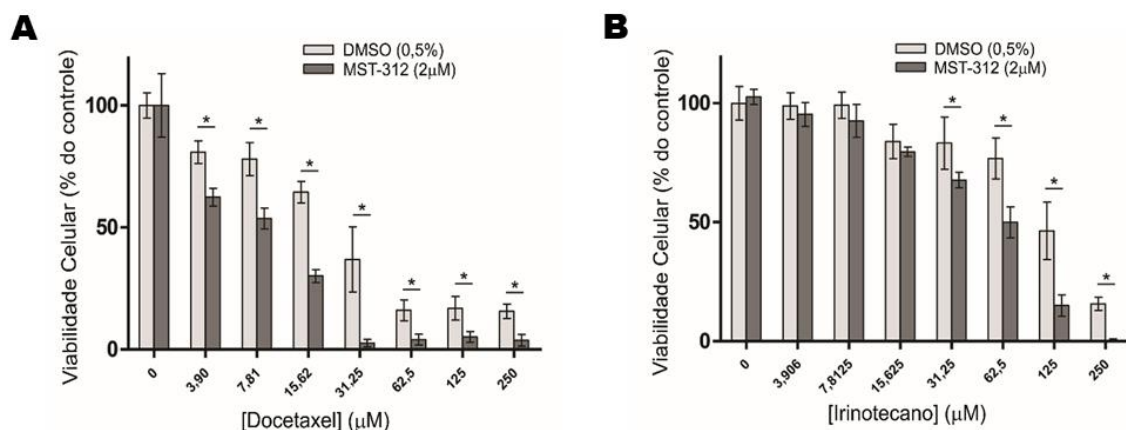


**Figura 16** – Perfil proliferativo da cultura monoclonal de MDA-MB-231 - Clone F9 - por ensaio de MTT: (A) Gráfico comparativo representando o padrão proliferativo da linhagem original MDA-231 e a linhagem clonal F9. Os valores do Tempo de duplicação foram de 53,51 horas (45,26 – 65,38) para linhagem original MDA-MB-231 e 39,54 horas (35,31 – 45,01) para linhagem clonal (B) Tratamento com MST-312 a 2  $\mu$ M demonstrou mudança no crescimento da cultura clonal. As células tratadas (em vermelho) mostraram um padrão proliferativo mais lento após 12 dias de cultivo quando comparadas com o controle, entrando em platô após 20 dias de exposição ao inibidor.

## 6.2 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE MST-312 COM QUIMIOTERÁPICOS – TRATAMENTO DE CURTO PRAZO

Em estudos prévios (130,175), foram observados os efeitos citotóxicos *in vitro* do inibidor de telomerase MST-312 e seu potencial antitumoral em curto prazo. Com o intuito de observar o efeito sinérgico do inibidor em associação com outros quimioterápicos, as células foram expostas ao MST-312 em associação aos quimioterápicos Docetaxel e Irinotecan em várias concentrações, por 48 horas, e analisadas por ensaio de viabilidade metabólica MTT (Figura 16). Células da linhagem MDA-MB-231 que não haviam sido expostas previamente ao inibidor de telomerase foram divididas em grupos controle (DMSO – veículo do MST-312) e tratado (MST-312 a 2  $\mu$ M). Ambos os grupos foram submetidos a diferentes concentrações dos quimioterápicos Docetaxel e Irinotecano separadamente e após 48 horas foram analisadas por ensaio de MTT. Foi observada maior sensibilidade ao tratamento, em

várias concentrações, nos grupos tratados com a associação em comparação àqueles tratados apenas com os quimioterápicos. O efeito da associação é mais evidente para o tratamento com Docetaxel (Figura 16-A).



**Figura 17** – Efeitos da associação de MST-312 com Docetaxel (**A**) e Irinotecan (**B**) em células de MDA-MB-231: Análise do padrão de viabilidade celular por ensaio de MTT após 48 horas de tratamento com quimioterápicos e MST-312. Os valores de IC50% são 22,51 µM e 10,09 µM para grupos de docetaxel com e sem MST-312, respectivamente, e 111,86 µM e 53,49 µM para grupos de irinotecano com e sem MST-312, respectivamente. Análise estatística dos dados de absorbância foi realizada por teste de *Two-way ANOVA* e pós teste *Bonferroni* (\*= $p < 0,01$ ).

### 6.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE MST-312 COM QUIMIOTERÁPICOS – TRATAMENTO DE LONGO PRAZO

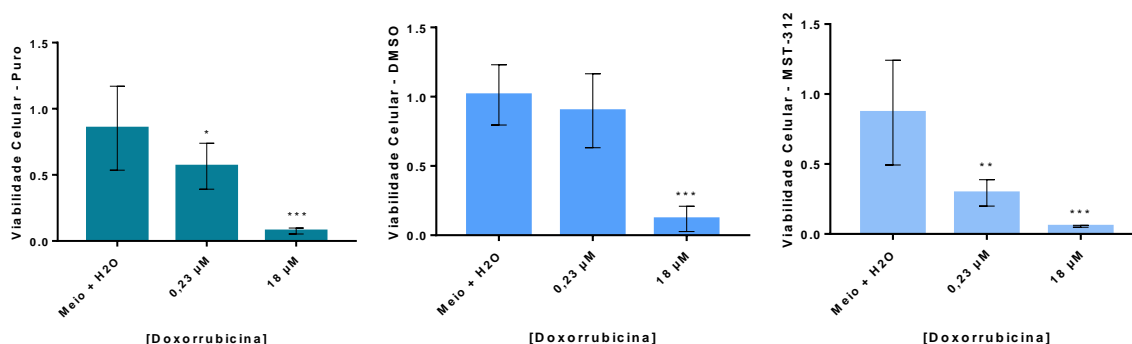
#### 6.3.1 Impacto do tratamento com MST-312 no cultivo celular

Foram determinados para a análise de exposição a longo prazo os seguintes grupos: Grupo P (sem tratamento), Grupo D (tratado com DMSO - dimetilsulfóxido, o veículo do inibidor) e Grupo M (tratado com o inibidor de telomerase MST-312 a 2 µM). Os grupos foram cultivados em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem a confluência de aproximadamente 80%, quando eram transferidas para nova placa

após tripsinização. O meio com os respectivos tratamentos era trocado a cada 2 dias. As células ficaram expostas ao tratamento durante todo o período do estudo de 8 semanas. O MST-312 não interferiu na capacidade de crescimento das culturas ao longo do período de exposição.

### 6.3.2 MST-312 em associação com Doxorrubicina

Para avaliar a ação da doxorrubicina no modelo *in vitro* após exposição ao MST-312, foi realizada a exposição ao inibidor de telomerase por 8 semanas e após esse período foi realizado o tratamento com doxorrubicina por 72 horas e posterior avaliação da viabilidade metabólica das culturas (Figura 17). Foi observado um padrão de resposta à doxorrubicina semelhante nos grupos sem tratamento prévio e tratados com inibidor de telomerase (P – puro e D – DMSO). Houve diferença apenas na concentração de 0,23  $\mu$ M de doxorrubicina quando comparados os dados dos grupos D e M, demonstrando maior sensibilidade à doxorrubicina no grupo previamente tratado com MST-312 nesta concentração; e resposta semelhante nas demais concentrações sem diferença estatística. Não foi observado aumento da sensibilidade ao quimioterápico provocado pela exposição prévia ao inibidor de telomerase MST-312 nesse modelo.

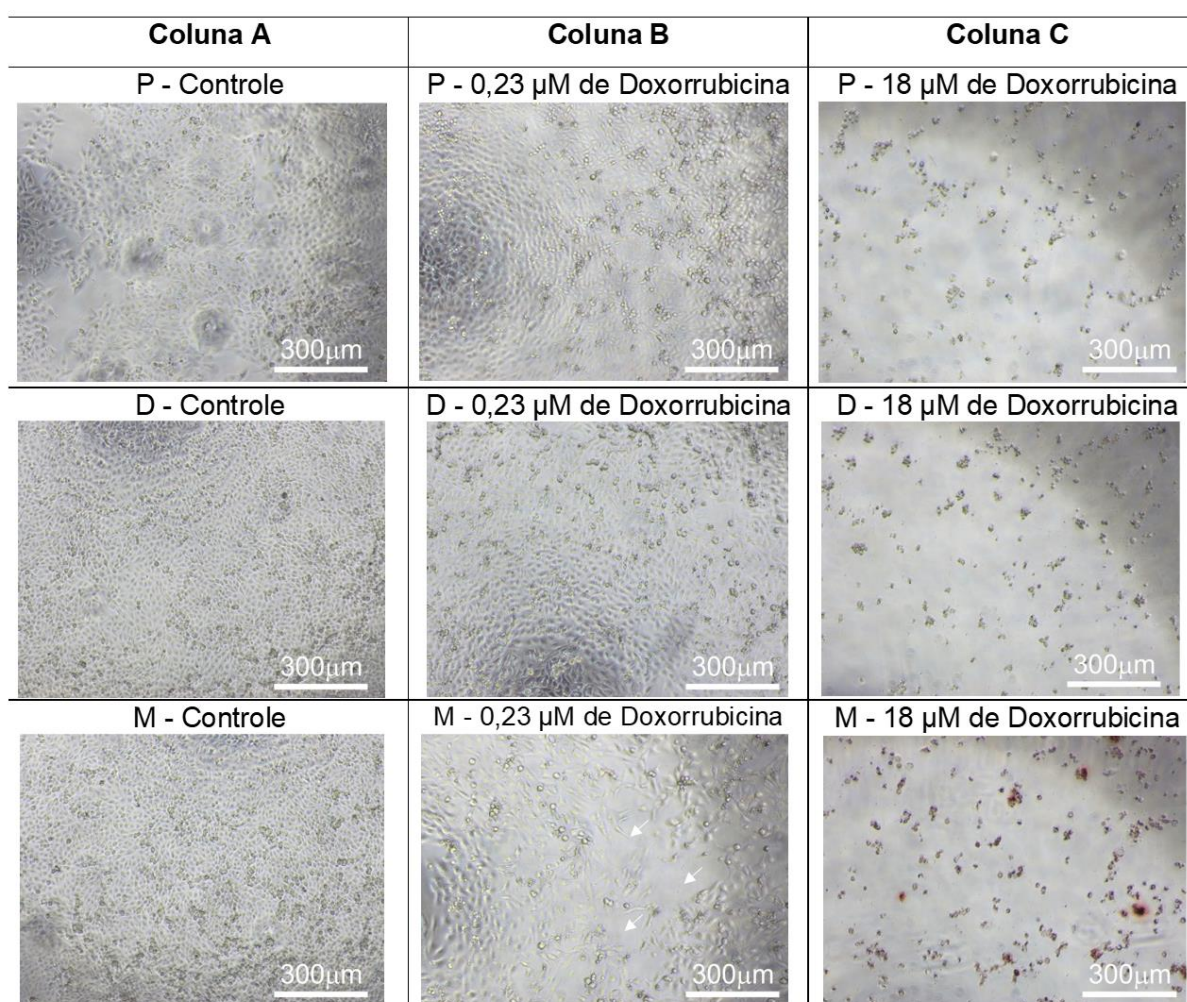


**Figura 18** – Viabilidade metabólica das culturas de células MDA-231: Avaliadas por ensaio de MTT após 8 semanas de exposição ao MST-312 e 72 horas de exposição à doxorrubicina, mensuradas por espectrofotometria. Análise estatística dos dados de absorbância foi realizada por teste de *Mann Whitney* (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).



### 6.3.3 Avaliação morfológica após exposição prolongada ao MST-312

Foi observado que células do grupo P (sem tratamento) levaram mais tempo para atingir confluência, quando comparado aos grupos D e M (veículo e MST-312, respectivamente). Na coluna A da Figura 18 é possível observar as micrografias dos grupos controles sem doxorrubicina, mostrando o grupo P com uma confluência inferior aos grupos D e M, com quantidades semelhantes de células iniciais ao plaqueamento ( $10^4$  células/ poço) e o mesmo período de cultivo (96 horas).

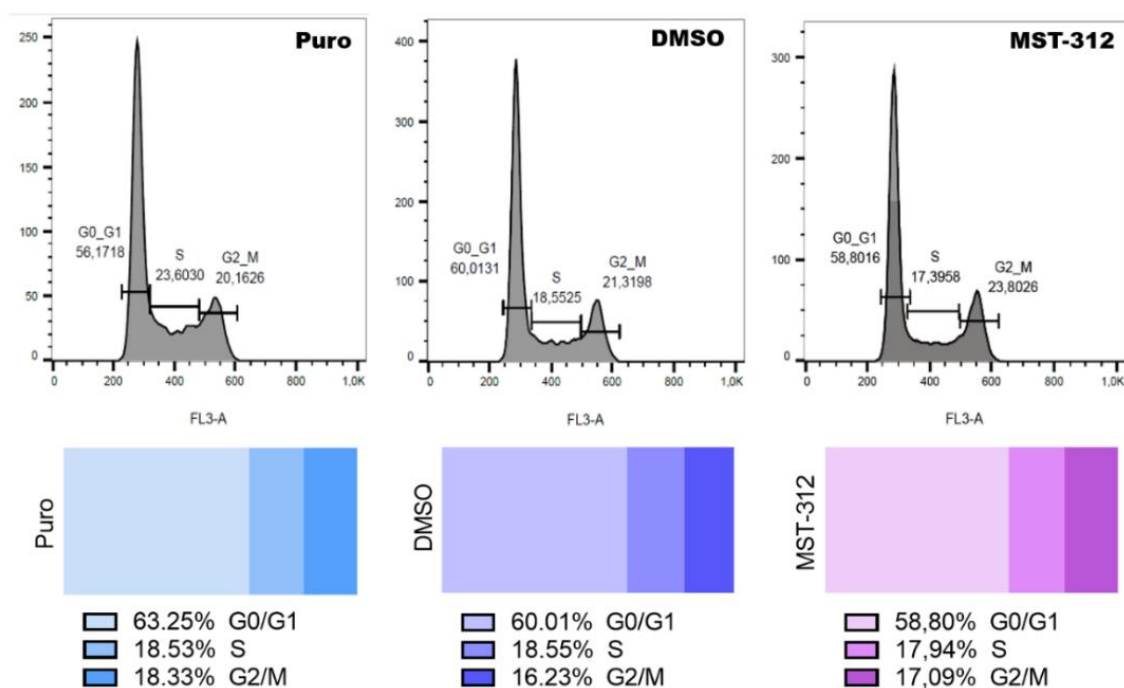


**Figura 19** – Painel de micrografias das culturas MDA-231: Imagens capturadas após 8 semanas de exposição ao MST-312 e 72 horas de exposição a doxorrubicina em diversas concentrações comparada com o controle (meio e água). Na imagem (P – grupo sem tratamento; D – grupo tratado com o veículo DMSO; M – grupo tratado com MST-312). Micrografias captadas com microscópio de contraste de fase em aumento de 40 vezes.

Na coluna B da Figura 18, observam-se as micrografias dos grupos na concentração para as quais as células tratadas com o MST-312 foram mais sensíveis a Doxorrubicina; e na coluna C, as micrografias ilustrando que houve resposta semelhante dos grupos nas outras concentrações de doxorrubicina. Não foi observada alteração de morfologia nas células tratadas com o inibidor após 8 semanas.

### 6.3.4 Avaliação do ciclo celular após exposição prolongada ao MST-312

Com o propósito de esclarecer o impacto da exposição ao MST-312 no ciclo celular foi realizado ensaio de avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Essa metodologia permite inferir se a célula está na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M (Figura 19).



**Figura 20** – Avaliação de ciclo celular das células MDA-231 previamente expostas ao inibidor de telomerase MST-312 por 8 semanas: Acima, histogramas obtidos através de citometria de fluxo indicando as fases do ciclo; abaixo, os gráficos referentes aos valores percentuais. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e tratado. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann Whitney* a partir dos valores obtidos pela mediana dos experimentos independentes.

Nesse ensaio as células previamente expostas por 8 semanas foram incubadas com iodeto de propídeo, que é um fluorocromo com capacidade de se intercalar nos ácidos nucleicos permitindo indicar a fase do ciclo através da fluorescência emitida pela quantidade de DNA na partícula analisada. Não foi observada diferença estatística significativa entre as fases do ciclo celular predominantes entre os grupos observados nesse modelo.

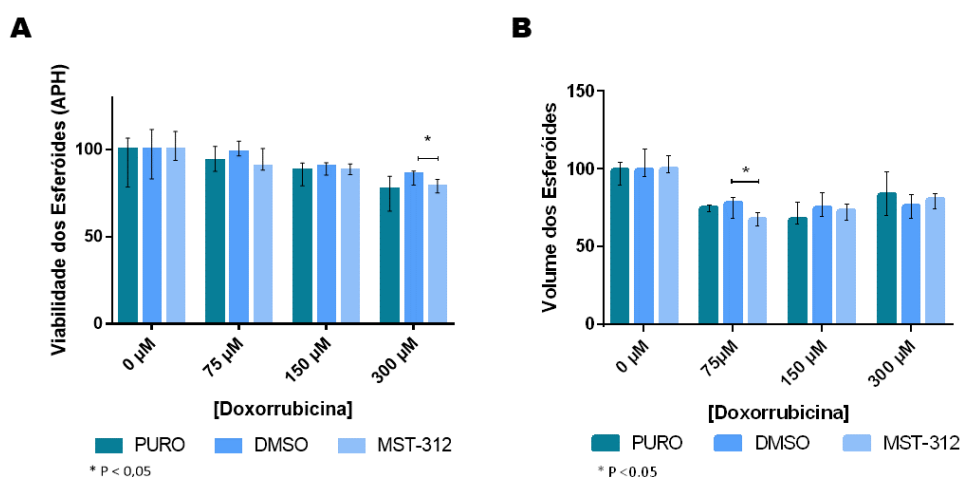
### **6.3.5 Formação de esferoides após exposição prolongada ao MST-312**

No intuito de observar se células tratadas com o inibidor de telomerase seriam capazes de formar agregados celulares, foi realizado o ensaio de cultura celular tridimensional. A cultura de células em monocamada apresenta dinâmica celular muito distante da realidade do tumor *in vivo*, devido à menor interação entre as células e ausência da formação de um microambiente típico do tumor. A cultura celular 3D tenta reduzir essa limitação metodológica possibilitando a avaliação do comportamento celular e suas interações entre células e formação de microambiente, mimetizando artificialmente um “parênquima”, ainda que muito rudimentar. A aplicação de técnicas que se aproximam cada vez mais dos aspectos encontrados *in vivo*, pode fornecer respostas valiosas sobre como as estratégias terapêuticas impactam no comportamento do tumor.

Após 8 semanas de exposição ao MST-312, foram realizadas culturas de MDA-231 em 3D (ou esferoides). As culturas foram analisadas quanto a capacidade de formar estruturas tridimensionais e quanto a viabilidade e volume após 96 horas de exposição à doxorrubicina. A formação dos esferoides ocorreu em todas as condições, demonstrando que o MST-312 não interferiu na capacidade celular de formar agregados na linhagem MDA-MB-231.

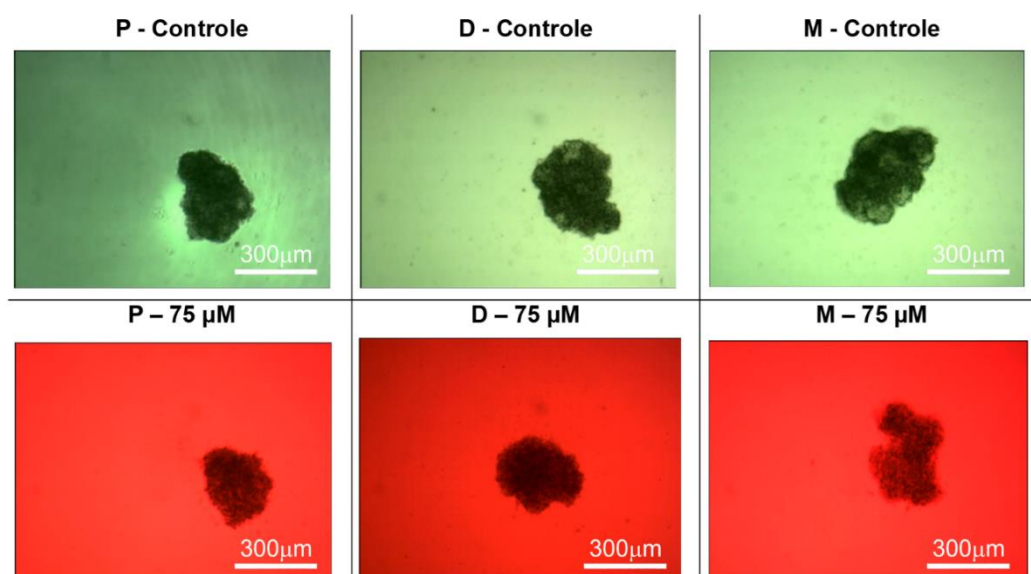
A avaliação quanto a viabilidade das culturas 3D (Figura 20-A) demonstrou diferença significativa na resposta ao quimioterápico Doxorrubicina quando comparado o grupo D e M em apenas uma concentração de 300  $\mu$ M. A avaliação quanto ao volume das culturas 3D (Figura 20-B) demonstrou que não houve diferença na formação dos esferoides na ausência de doxorrubicina, afastando a hipótese de

alteração da capacidade de formar agregados pela exposição prévia ao inibidor de telomerase. Foi observada diferença significativa na resposta ao quimioterápico Doxorubicina quando comparados os grupos D e M em apenas uma concentração (75  $\mu$ M).



**Figura 21** – Avaliação da viabilidade dos esferóides por APH mensuradas por espectrofotometria (**A**) e Avaliação do volume final dos esferóides de MDA-231 por fotodocumentação em microscópio de contraste de fase (**B**) após 96 horas de exposição à Doxorubicina. Análise estatística dos dados de absorbância (viabilidade) e de volume (coletados pelo *software ImageJ*) foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney* (entre grupos D e M) e *Kruskal Wallis* (entre os grupos P, D e M) (\*= $p < 0,05$ ).

Na figura 21 é possível observar a fotodocumentação dos esferóides nos grupos controle e no grupo tratado na concentração de 75  $\mu$ M de doxorubicina. À manipulação, foi possível observar que os esferóides tratados eram mais frágeis que os não tratados, o que não pode ser confirmado pelo resultado de viabilidade. A redução de volume dos esferóides na concentração de 75  $\mu$ M de doxorubicina levanta a possibilidade de alguma atuação do MST-312 na sensibilização à doxorubicina.

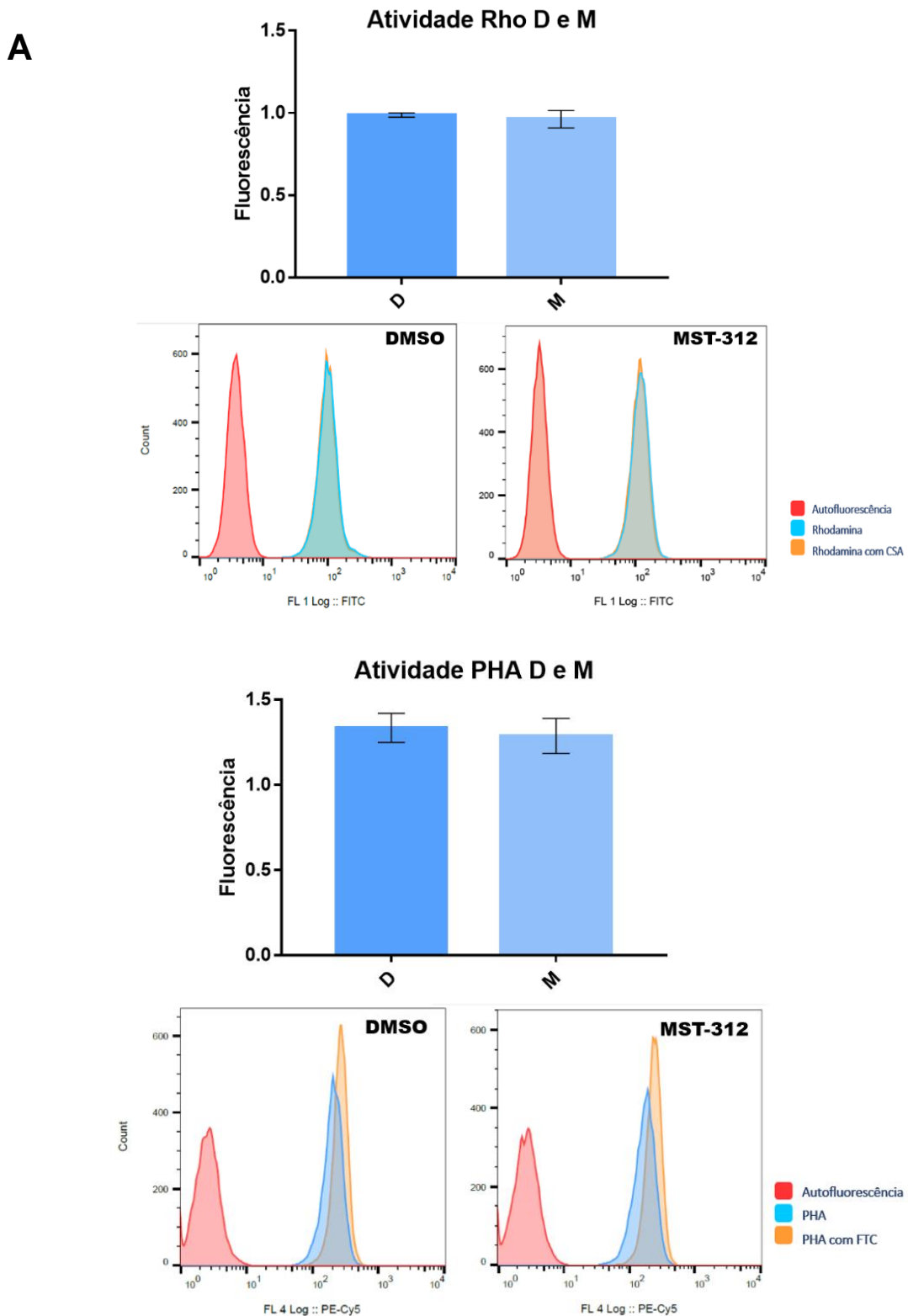


**Figura 22** – Fotodocumentação dos esferoides de MDA-231 cultivados em meio puro (controle) e meio com doxorubicina a uma concentração de 75  $\mu\text{M}$  (P – grupo sem tratamento; D – grupo tratado com o veículo DMSO; M – grupo tratado com MST-312). Micrografias captadas com microscópio de contraste de fase em aumento de 40 vezes.

### 6.3.6 Atividade de bombas de efluxo após exposição prolongada ao MST-312

A investigação de aquisição de mecanismos de resistência nas células previamente expostas por 8 semanas ao inibidor de telomerase MST-312 foi realizada através de pesquisa de expressão e atividade de proteínas de transporte ABC (*ATP-binding*) amplamente descritas na literatura como proteínas relacionadas a aquisição de resistência a múltiplas drogas (Figura 22).

Os ensaios de atividade buscam esclarecer se as proteínas são funcionais, ou seja, são capazes de realizar a extrusão dos substratos. Para isso, foram utilizadas moléculas sabidamente conhecidas pela sua afinidade com as bombas de efluxo (substratos que emitem fluorescência) e moléculas que funcionam como competidores (moduladores).



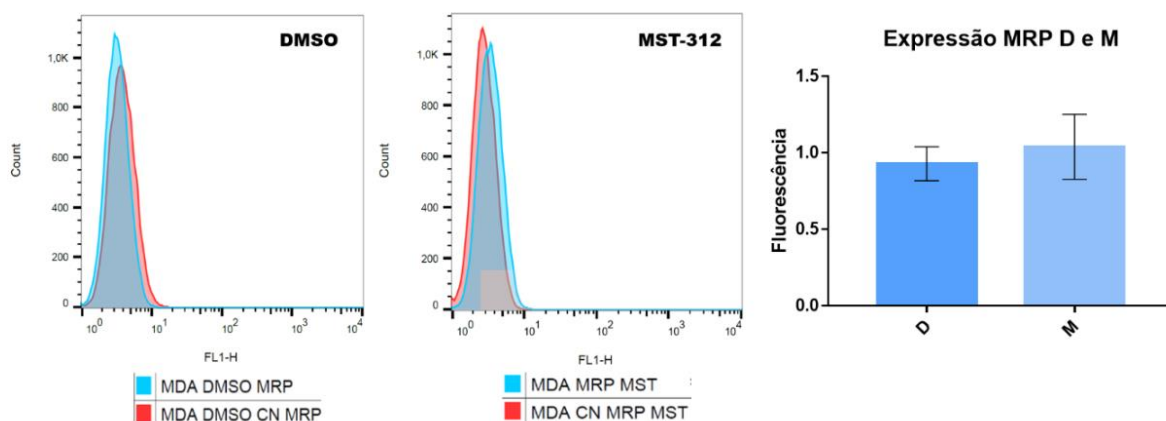
**Figura 23** – Atividade de P-gp e MRP1 em células MDA-MB-231 (**A**) após 9 semanas de exposição ao MST-312 avaliadas por citometria de fluxo: À esquerda, histogramas referentes ao ensaio funcional da bomba de efluxo MRP1 utilizando como substrato a Rodamina 123 (Rho) e o seu modulador Ciclosporina A (CSA). À direita, gráfico representativo da razão de intensidade de fluorescência, demonstrando que não foi observado diferença significativa entre os grupos. A análise estatística foi

realizada pelo teste de *Mann Whitney* com  $*=p < 0,05$ . Atividade de BCRP em células MDA-231 (B) após 9 semanas de exposição ao MST-312 avaliadas por citometria de fluxo: À esquerda, histogramas referentes ao ensaio funcional da bomba de efluxo BCRP utilizando como substrato *Pheophorbide A* (PHA) e seu modulador Fumitremorgin C (FTC). À direita, gráfico representativo da razão de intensidade de fluorescência, demonstrando que não foi observada diferença significativa entre os grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann Whitney* com  $*=p < 0,05$ .

Quando a proteína está superexpressa e ativa, ocorre o efluxo dessas moléculas e a sua redução intracelular nos grupos avaliados apenas com o substrato. Nos grupos avaliados com modulador ocorre o oposto, pois devido a competição o substrato fica retido no meio intracelular. No histograma, observa-se a intensidade dos picos de fluorescência entre os grupos avaliados com substrato e substrato + modulador. Foram realizados ensaios para avaliação de atividade das proteínas P-gp, MRP1 e BCRP. Os resultados demonstraram que não foi identificada atividade dessas bombas nos grupos estudados, sugerindo que a exposição de 8 semanas ao inibidor de telomerase MST-312 não interfere na aquisição de fenótipo MDR pela atividade das bombas analisadas nesse modelo.

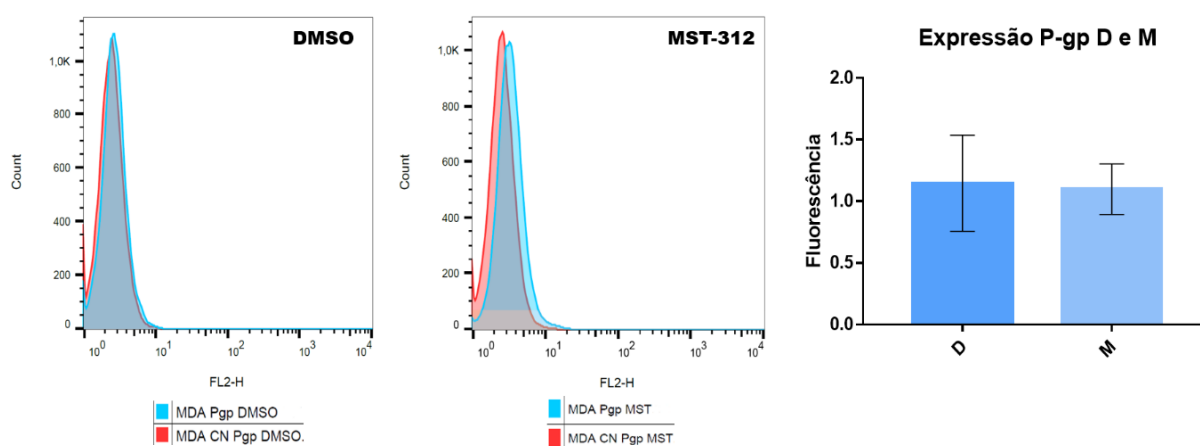
### **6.3.7 Expressão de bombas de efluxo após exposição prolongada ao MST-312**

Visto que não houve atividade mensurável, foi avaliada a expressão das proteínas P-gp e MRP1, por ensaio de citometria de fluxo. O objetivo deste ensaio é identificar a presença das proteínas, independentemente da sua atividade. Para isso as células são marcadas com anticorpo fluorescente específico para as proteínas. A análise dos dados baseia-se na intensidade de fluorescência das imunomarcações quando comparada a autofluorescência das células. Após 8 semanas de exposição ao MST-312 as células foram submetidas ao ensaio de avaliação da expressão de bombas de efluxo P-gp e MRP1. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e tratado (Figura 23 e 24).



**Figura 24** – Dados de expressão de MRP: À esquerda, histogramas referentes ao ensaio de imunomarcção dos grupos DMSO e MST-312 após cultivo de 8 semanas, onde CN é controle negativo e MRP é o grupo marcado com anticorpo anti-MRP. À direita, gráfico representativo da razão de intensidade de fluorescência, demonstrando que não foi observada diferença significativa entre os grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann Whitney* com  $*=p < 0,05$ .

Os resultados demonstram que a exposição prolongada *in vitro* de 8 semanas ao MST-312 não induziu a superexpressão de P-gp/MRP1 e atividade das bombas de efluxo P-gp, MRP1 e BCRP, que são importantes proteínas para aquisição de resistência e fenótipo MDR, sugerindo que o MST-312 não promoveu este tipo de resistência a múltiplas drogas, nesse modelo.



**Figura 25** - Dados de expressão de P-gp: À esquerda, histogramas referentes ao ensaio de imunomarcção dos grupos DMSO e MST-312 após cultivo de 9 semanas, onde CN é controle negativo e Pgp é o grupo marcado com anticorpo anti-Pgp. À direita, gráfico representativo da razão de intensidade de fluorescência, demonstrando que não foi observada diferença significativa entre os grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann Whitney* com  $*=p < 0,05$ .



## 7 DISCUSSÃO

A terapia antitelomerase tem elevado potencial de aplicação em oncologia considerando a relativa seletividade que o alvo farmacológico lhe confere para células tumorais. A atuação da telomerase além da sua função catalítica de alongamento de telômeros está consolidada. Os efeitos da telomerase que abrangem desde a proteção de danos ao DNA, redução do estresse oxidativo e inibição de apoptose devem ser considerados na estratégia de abordagem terapêutica baseada na telomerase. Focar apenas na sua função canônica pode negligenciar uma ampla interação com os mecanismos de promoção e manutenção do processo oncogênico, além de possibilitar adaptações indesejáveis como a seleção de clones com telômeros maiores e com maior capacidade proliferativa (175).

Dados prévios do grupo demonstraram que o inibidor de telomerase MST-312 possui ação citotóxica a curto prazo, mas em exposição a longo prazo foi capaz de promover o predomínio de células com características distintas da sua linhagem original em células de câncer de mama. No tratamento com MST-312 por 180 dias, as células adquiriram um padrão proliferativo diferente da sua linhagem original, sugerindo a aquisição de mecanismos de resistência ao tratamento antitelomerase (130, 175, 206).

As células tratadas com MST-312 por 180 dias mantiveram a capacidade proliferativa semelhante a encontrada no seu grupo controle tratado com DMSO até aproximadamente os 70 dias de cultivo, seguindo mais competentes até o final do estudo, apresentando um tempo de duplicação de 32,07 horas no grupo tratado (MST-312) e 58,34 horas no grupo controle (DMSO) (175). Os resultados demonstraram o potencial citotóxico do MST-312 a curto prazo e a capacidade do tratamento a longo prazo de induzir seleção de células com características específicas, que poderiam influenciar (numa projeção para a lesão neoplásica) na agressividade do tumor.

As linhagens analisadas no presente estudo responderam de forma diferente ao uso prolongado do MST-312, sugerindo que a inibição da telomerase interfere em mecanismos variados, baseado nas diversas funções da telomerase no contexto das aptidões celulares do câncer que vão além da função de manutenção dos telômeros (74). Inúmeros possíveis biomarcadores preditivos e prognósticos descritos em câncer

de mama como a p53, VEGF e PARP que tem forte relação com o potencial de proliferação das células (211) também estão sob influência da telomerase (108-110, 120, 134), sugerindo que essa redundância biológica pode ser perturbada pela inibição da telomerase, promovendo respostas diversas.

A heterogeneidade intratumoral é um desafio para a oncologia clínica, pois interfere diretamente na aquisição de fenótipos de resistência e dificulta a aplicação de monoterapias e esquemas terapêuticos prolongados (187). Células resistentes têm considerável relevância para o uso de drogas *in vivo*, visto que esse é um fator que confere maior agressividade ao tumor e representa uma característica de potencial causa de falha terapêutica, que por sua vez leva a prognósticos desfavoráveis, reincidência da doença e redução da sobrevida global.

A interação célula-célula e célula-microambiente atuam intrinsecamente na seleção, seja pela pressão seletiva imposta pelo acesso aos nutrientes e oxigênio ou pela exposição aos quimioterápicos ou outros agentes externos. A observação do comportamento proliferativo de cultura monoclonal sugere que a heterogeneidade da linhagem é fundamental para que a pressão seletiva imposta pelo tratamento prolongado com o inibidor de telomerase MST-312 leve à seleção de clones responsáveis pela redução da resposta da cultura celular ao tratamento com o inibidor e pela mudança do padrão de comportamento proliferativo. Tal hipótese é corroborada pelos dados acerca do tamanho relativos dos telômeros de células submetidas ao tratamento com o inibidor.

Embora os resultados moleculares da exposição a longo prazo ao inibidor de telomerase tenham levantado a possibilidade de seleção induzida pelo tratamento prolongado e aquisição de características de resistência ao tratamento com o MST-312 (o que a princípio poderia contestar a segurança da abordagem com inibidores de telomerase por longos períodos) esses resultados não anulam o potencial terapêutico da ação precoce deste inibidor. A terapia com foco no encurtamento ou erosão telomérica seria o mecanismo mais óbvio do inibidor de telomerase, levando aos efeitos desejados de crise e apoptose das células cancerosas. Porém, ensaios clínicos com inibidores de telomerase demonstraram que o intervalo de tempo para a resposta clínica por esse mecanismo é longo, por requerer muitos ciclos mitóticos, implicando em toxicidade e acúmulo de efeitos adversos (70, 165, 166).

Os estudos de exposição ao MST-312 por curto período demonstraram que o seu efeito citotóxico a curto prazo levanta a possibilidade de ação antitumoral por outros mecanismos (176, 212). Essa atuação precoce da inibição da telomerase corrobora com trabalhos recentes que descrevem as ações não-canônicas da telomerase (96). Dados da literatura sugerem que a telomerase atua no ciclo celular influenciando os mecanismos de reparo de danos ao DNA (99, 100); promoção do crescimento e proliferação celular (101); aceleração do ciclo celular (102); regulação do metabolismo e sobrevivência celular; interferindo em importantes vias de sinalização que estão direta ou indiretamente ligadas a sustentabilidade do tumor e a aquisição de malignidade (74) e pode justificar a atuação citotóxica do MST-312 a curto prazo.

Considerando se tratar de composto inespecífico, são esperadas ações em outros alvos moleculares com potencial de enviesar as conclusões dos experimentos, mas resultados recentes envolvendo culturas com expressão de hTERT silenciada revelam que as ações citotóxicas a curto prazo do MST-312 são telomerase-dependentes (dados do grupo submetidos para publicação), o que ratifica a telomerase como alvo terapêutico viável, elegendo seus inibidores como potenciais drogas na terapia oncológica e consolidando o conhecimento que vem sendo descrito acerca das funções não canônicas da telomerase e da sua importância para a manutenção dos mecanismos celulares que lhe conferem as características das células cancerosas (74).

A combinação de drogas na clínica oncológica é uma estratégia que visa à redução de doses requeridas e potencialização do efeito de drogas de forma sinérgica. O estudo do MST-312 em associação a quimioterápicos se apresentou como uma alternativa promissora à monoterapia de duração excessivamente longa. Os dados do presente trabalho demonstraram que a associação em esquema de co-tratamento apresentou atividade citotóxica superior àquela do quimioterápico isolado. Essa abordagem reduziria a possibilidade de seleção clonal de células com características fenotípicas de resistência sem abrir mão do potencial terapêutico do inibidor MST-312, amplificando, ao invés disso, os efeitos citotóxicos precoces por interferência nas ações não canônicas da telomerase (74).

Na prática clínica, a toxicidade de quimioterápicos pode ser reduzida se for realizada a administração combinada com drogas que tenham mais especificidade

tumoral, mesmo que em baixas doses (177). O uso combinado de MST-312 com doxorubicina poderia se beneficiar desse mecanismo, visto que o inibidor de telomerase tem como alvo uma molécula presente predominantemente nas células cancerosas; e a doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica oncológica e com toxicidade considerável, que pode provocar mielossupressão, acometer os tecidos cardíacos e inclusive ter seus efeitos deletérios por anos após o tratamento (207, 208); impactando diretamente na qualidade de vida do paciente. A escolha da droga doxorubicina para este estudo foi baseada na sua ampla utilização em oncologia mamária e com base em extensivas pesquisas demonstrando os diferentes mecanismos de toxicidade e resistência na sua utilização (207-210).

Outros trabalhos demonstraram a inibição da telomerase associada à sensibilidade aumentada a fármacos tanto em células de câncer de mama tratadas com doxorubicina (213) quanto em outros tipos de câncer (177, 214, 215). A atuação sinérgica entre MST-312 e Doxorubicina foi descrita em culturas de células de leucemia linfoblástica aguda pré-B, amplificando a ação citotóxica das drogas e potencializando o efeito apoptótico do quimioterápico em modelos *in vitro*. No modelo do presente estudo, apesar dos dados animadores na associação por co-tratamento, não foi observado aumento da sensibilidade ao quimioterápico provocado pela exposição prévia ao inibidor de telomerase MST-312.

No presente estudo, não foi observada alteração de morfologia nas células tratadas com o inibidor após 8 semanas. Entretanto, o cultivo prolongado com inibidor de telomerase MST-312 foi capaz de induzir alterações morfológicas em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 (130) sustentando a hipótese de seleção de células pela pressão provocada devido a longa exposição ao MST-312. Em células de pulmão da linhagem H460, o MST-312 também foi capaz de causar alterações na morfologia das células levando a duas subpopulações com características distintas após 6 semanas de cultivo (216). Outros inibidores de telomerase, como o TMPyP4, também provocou mudanças na morfologia em tratamentos de até 240 horas (217).

Vários trabalhos já referenciaram a atuação da telomerase na proliferação celular (74, 96, 97). De fato, a alteração do perfil de distribuição da cultura nas fases do ciclo horas após a administração do MST-312 já é conhecida, nesse estudo investigamos se a exposição a longo prazo ao inibidor alteraria o perfil do ciclo celular por aumento ou redução da duração de uma das fases (o que alteraria as proporções

no histograma), entretanto, nesse modelo, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos analisados. Já foi relatado que o MST-312 pode alterar a proporção predominante das fases do ciclo celular em cultura de células de câncer de pulmão exposta por longos períodos (176), sugerindo consequências permanentes no controle do processo de divisão celular, porém VILLARINHO, 2020 relatou não ter observado alteração nas fases do ciclo celular em células de câncer de pulmão após exposição ao MST-312 por 6 semanas (216), o que pode indicar diversidade na resposta ao inibidor.

Estudo com células de câncer de pulmão demonstrou redução significativa na formação de estruturas tridimensionais em células tratadas previamente com MST-312 por 12 semanas (216). No presente estudo a formação dos esferoides ocorreu em todas as condições, demonstrando que o MST-312 não interferiu na capacidade celular de formar agregados na linhagem MDA-MB-231 nesse modelo, sugerindo que, também para esse parâmetro, a resposta ao inibidor pode variar com a linhagem ou condições experimentais.

A resposta celular geral ao quimioterápico doxorrubicina em ambos os experimentos de viabilidade (monocamada e tridimensional) e na avaliação de volume dos esferoides, a baixa atuação observada no ensaio de ciclo celular (frente ao já demonstrado potencial farmacológico do MST-312), bem como as adaptações bioquímicas providas pela exposição ao composto, levantaram a hipótese de que o tratamento com o inibidor poderia promover a aquisição de resistência. Já foi demonstrado em outros trabalhos resultados que indicam o poder desse inibidor em selecionar clones e induzir alterações fenotípicas sugestivas de resistência (130, 175, 216). Na prática clínica, a resistência a múltiplas drogas se traduz em tratamento prolongado, doença agressiva e de difícil controle, com redução da qualidade de vida e da sobrevida livre de doença (184). A possibilidade de resistência precisa ser amplamente estudada para elucidar seus mecanismos antes de se considerar a aplicação clínica de qualquer estratégia terapêutica.

Um dos mecanismos mais estudados de aquisição de resistência a múltiplas drogas em células de câncer é a superexpressão de bombas de efluxo, representadas principalmente pelas proteínas ABC, em especial a P-gp, MRP1 e BCRP (187). Essas proteínas funcionam como transportadores de membrana e atuam diretamente na distribuição da droga entre o meio intra e extracelular. Distúrbios na expressão dessas

proteínas podem causar uma redução na concentração efetiva das drogas no meio intracelular, onde elas devem atuar.

A expressão de proteínas ABC perpassa por complexas vias de sinalização celular. A regulação transcricional das proteínas pode seguir vias diferentes a depender da subfamília (218). As complexas interações entre as moléculas e fatores que atuam nessa intrincada rede não estão completamente elucidadas. Já foi demonstrado que vias relacionadas à proliferação e ciclo celular tem relação com a sinalização que promove a expressão de proteínas ABC, especialmente a P-gp. A ativação de vias chave como Wnt- $\beta$ -catenina; Nf- $\kappa$ B e p53 são conhecidos caminhos que atuam na expressão dessas proteínas (219, 220). Interessante ressaltar, que essas mesmas vias de sinalização são influenciadas por hTERT na sua atuação não canônica (96, 97, 118). Baseado nessa redundância biológica, tornou-se importante descartar a possibilidade de o inibidor de telomerase impactar indiretamente na expressão e atividade dessas proteínas.

Inúmeros estudos reportam a atuação de TERT além da manutenção telomérica. Já foi descrito que TERT pode atuar na regulação da expressão gênica. Alguns autores demonstraram que TERT pode interagir com BRG1, que é um fator de remodelamento de cromatina relacionado a regulação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, e pode atuar também como cofator no complexo de transcrição  $\beta$ -catenina (221), além de apresentar uma forte similaridade com Myc (222). As possibilidades da sua versátil atividade incluem remodelamento da estrutura da cromatina e contribuição nas vias de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina e Nf- $\kappa$ B (96). Essas vias estão intrinsecamente relacionadas com as potencialidades do câncer de proliferação celular, migração e regeneração (121); mas também são as mesmas vias que atuam na superexpressão de proteínas de transporte relacionadas a resistência a múltiplas drogas.

O nosso modelo não permite fazer uma correlação direta, se o MST-312 atuando através da inibição da telomerase, indiretamente estaria também interferindo nas vias de superexpressão de proteínas ABC. Essa afirmação exige que mais estudos sejam realizados; mas fundamentado no conhecimento atualmente acumulado sobre as ações não canônicas da telomerase, é plausível levantar essa hipótese. Estudos sugerem que a telomerase pudesse interagir com fatores de transcrição e/ou fatores modificadores de cromatina que regulam a transcrição de

genes alvo dessas vias (96, 222). É possível afirmar que a relação entre TERT e a via Wnt/ $\beta$ -catenina existe, embora ainda não bem elucidada. Em contrapartida, foi relatado que a ativação da expressão de MDR1 em células de câncer de mama pode ser regulado positivamente pela via canônica de Wnt/ $\beta$ -catenina (223), e que a ativação de  $\beta$ -catenina aumenta a expressão de ABCB1 (219, 224). A expressão de ABCG2 também pode ser aumentada de forma dependente da sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina (225).

Outra via extremamente importante para a transcrição gênica das proteínas de efluxo é a via Nf-kb. Esse fator transcricional pode regular a expressão de vários genes diretamente relacionados à tumorigênese como a proliferação, angiogênese, invasão, metástase, inibição da apoptose (226). Foi demonstrado que Nf-kb pode ativar a transcrição do gene de ABCB1 (220); e que é possível inibir a sua transcrição, regulando essa mesma via (227). Esses estudos sugerem que a via Nf-kb é capaz de interferir na regulação transcricional de proteínas ABCB1 (228). Contudo, há relatos na literatura de que TERT regula a expressão de vários genes como IL6, IL8 e TNF- $\alpha$ , cuja a transcrição é controlada pela via Nf-kb (118); foi observado também que a telomerase regula diretamente a expressão gênica dependente de Nf-kb, ligando-se à subunidade p65 no núcleo e regula especificamente o recrutamento de um subconjunto de promotores dependentes de genes alvo Nf-kb como os que codificam IL-6 e TNF- $\alpha$  (118, 229-231); e que é possível suprimir Nf-kb dependente de telomerase com o uso do MST-312, contribuindo nos mecanismos de apoptose (176).

TERT também pode atuar contribuindo para a ativação ou repressão de genes alvo MYC (97). Foi relatado que TERT estabiliza MYC diretamente na cromatina e pode regular a ligação de MYC a promotores de genes alvo dessa via de sinalização, contribuindo para sua ativação ou supressão (232). Foi relatado que a expressão de alguns transportadores como MRP1 e BCRP foi aumentada pela superexpressão de c-Myc em células de câncer de mama, sugerindo que a amplificação de c-Myc pode modular a expressão desses transportadores (233). Em células de leucemia mieloide crônica e adenocarcinoma de cólon, foi descrito que a oncoproteína c-Myc é um regulador transcricional direto de um grande conjunto de transportadores ABC (234, 235).

As vias de sinalização celular são complexas e repletas de lacunas a serem descobertas. As vias de sinalização nas células de câncer são um universo a parte

que oferecem desafios ainda maiores, dado a heterogeneidade celular e a instabilidade genômica. Devido a esses fatores, é possível que as mesmas vias possam desempenhar papéis distintos a depender do tipo de câncer. O que se pode afirmar até então, é que existem pontos de convergência entre as vias de superexpressão de proteínas ABC e a atuação não canônica da telomerase. Para esclarecer a relação entre os dois pontos, mais estudos precisam ser realizados.



## 8 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o inibidor de telomerase MST-312 tem potencial citotóxico a curto prazo, sugerindo que este inibidor pode interferir na atuação não canônica da telomerase. Foi demonstrado que a exposição prolongada ao MST-312 pode induzir adaptações e seleção de células com características distintas da linhagem original, entretanto, o MST-312 não induziu variação significativa na formação e crescimento de estruturas tridimensionais e não interferiu na atividade e expressão das bombas de efluxo do fenótipo de resistência à múltiplas drogas (P-gp/MRP1 e BCRP). Os resultados demonstraram que o tratamento prévio com MST-312 não sensibiliza as células à ação dos quimioterápicos, mas a associação a curto prazo tem potencial terapêutico.

## 9 PERSPECTIVAS

A imortalização celular é um dos mecanismos de manutenção da célula cancerosa que a torna capaz de produzir tumores. Mais de 85% dos tumores fazem uso da via clássica de imortalização, que consiste na expressão da enzima telomerase para a manutenção da doença; Outros 15% usam outra estratégia conhecida como Alongamento Alternativo de Telômeros, ou AAT, mecanismo que ainda não foi completamente elucidado (65). Ao contrário da enzima telomerase, nenhum inibidor de AAT foi desenvolvido devido à ausência de moléculas especificamente relacionadas a esse mecanismo (60).

A análise comparativa entre células AAT+ e AAT- representaria um modelo objetivo de abordagem direta na busca desses alvos. Porém, a comparação de linhagens celulares de diferentes origens reduz a robustez dos resultados e a sensibilidade da análise devido à heterogeneidade das culturas. O projeto original deste doutorado tinha como objetivo realizar o desenvolvimento de células AAT+ e AAT- oriundas da mesma linhagem celular, portanto, geneticamente comparáveis.

Foram realizados ensaios de transfecção para inclusão de gene de inibição da telomerase em células da linhagem U251 para obter linhagens comparáveis, com fenótipos AAT + e AAT-. Após seleção clonal foi observado a desinibição do gene hTERT, com retorno da expressão da telomerase em níveis comparáveis a linhagem original. Devido a limitação metodológica imposta pela resposta celular que inviabilizou todo o desenho experimental e a proposta de comparação das linhagens de mesma origem com fenótipos distintos quanto ao mecanismo de manutenção do telômero (alongamento alternativo de telômeros), foi proposto à banca de qualificação deste programa a alteração do projeto original. Não obstante, a revisão bibliográfica realizada durante a execução do cronograma original gerou um artigo de revisão sobre alongamento alternativo de telômeros (ANEXO II).

Em vista dos resultados inesperados do projeto, investiu-se em complementar o estudo iniciado no mestrado, respondendo questões que não puderam ser contempladas no período da vigência do curso e que se mostraram relevantes para a compreensão dos mecanismos de imortalização celular e que possibilitaram a publicação de um artigo em revista A2 no período do doutorado (ANEXO III). Em

estudos prévios demonstramos que o uso prolongado de inibidor de telomerase em células de câncer de mama foi capaz de promover pressão seletiva de células com fenótipos atípicos, como a superexpressão de telomerase (130), sugerindo que a exposição por longo período de tempo poderia estar envolvido na indução de mecanismos de resistência.

O trabalho desenvolvido por este grupo de pesquisa com células de câncer de mama apresentou resultados relevantes e revelou a importância de se considerar a heterogeneidade tumoral em tratamentos por longos períodos, sugerindo a possibilidade do uso de inibidores de telomerase estarem relacionados a promoção de pressão seletiva nas células tumorais. Entretanto, o uso prolongado do MST-312 demonstrou também interferir na sensibilidade aos quimioterápicos docetaxel e irinotecano, aumentando os efeitos citotóxicos desses fármacos (175). A compreensão dos mecanismos de resistência apresentados pelo uso prolongado do inibidor de telomerase MST-312, e a divulgação desses achados no meio científico, podem contribuir para o entendimento e a construção de critérios de uso dessas terapias na clínica médica.

Foi proposto para o atual projeto, complementar o estudo anterior com a avaliação da expressão de mecanismos de resistência a múltiplas drogas e alterações morfológicas em células de câncer previamente submetidas à exposição prolongada ao inibidor de telomerase MST-312 através da determinação do fenótipo MDR (expressão de proteínas relacionada à resistência a múltiplas drogas subtipo 1 - MRP1); perfil de proliferação em culturas 2D/3D; e o papel adjuvante do inibidor de telomerase e o seu potencial terapêutico. O presente trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Hemato-Oncologia do Instituto Nacional do Câncer – INCA e financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.

O mesmo desenho experimental deste trabalho foi desenvolvido integralmente em mais outras 3 linhagens de células de câncer (MCF7 – adenocarcinoma mamário; A431 – carcinoma epidermóide; A549 – carcinoma de pulmão). Os resultados dessas análises não foram contemplados nessa tese devido a necessidade de análises adicionais, que foram em parte, inviabilizadas temporariamente devido à pandemia de COVID-19 (Anexo I).

O propósito do projeto inclui complementar as análises das outras linhagens que não foram descritas nesse trabalho; finalizar as análises da linhagem MDA-231

que não puderam ser descritas nos resultados, cujo os dados já foram coletados, assim como a expressão gênica de BCRP, a análise histopatológica dos esferoides, a análise imunocitoquímica dos grupos estudados e a comparação da resposta entre as diversas linhagens. Estes dados permitiriam conclusões mais assertivas acerca do potencial terapêutico do MST-312 como adjuvante na terapia oncológica, consolidar os conhecimentos sobre a atuação não canônica da telomerase e elucidar os mecanismos de aquisição de fenótipo de resistência a múltiplas drogas induzida pelo uso de inibidor de telomerase em diversos tipos de células de câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandão CM, Guerra AA, Jr., Cherchiglia ML, Andrade EI, Almeida AM, da Silva GD, et al. Expenses of the Brazilian Ministry of Health for high-cost drugs: a demographic and clinical analysis. **Value Health**. 2011;14(5 Suppl 1):S71-7.
2. Shim JS, Liu JO. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **Int J Biol Sci**. 2014;10(7):654-63.
3. INCA - Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. 2019 p. 122.
4. SAÚDE OMD. Perfis oncológicos de los países. 2014.
5. Gobbi H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2012;48:463-74.
6. Cunningham HSSHB. *Ginecologia de Williams*. edição, editor. Porto Alegre: Artmed Editora; 2014.
7. INCA. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. . Rio de Janeiro2019.
8. Carels N, Spinassé LB, Tilli TM, Tuszynski JA. Toward precision medicine of breast cancer. *Theor Biol Med Model*. 2016;13:7.
9. Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*. 2009;9:84.
10. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-93.
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
13. Zhu Y, Wu J, Zhang C, Sun S, Zhang J, Liu W, et al. BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(43):70113-27.
14. Turashvili, G e Brogi, E; Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. **Frontiers in medicine**, v.4 artigo 227, dezembro 2017.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
16. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
17. de Bruin EC, Taylor TB, Swanton C. Intra-tumor heterogeneity: lessons from microbial evolution and clinical implications. *Genome Med*. 2013;5(11):101.
18. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*. 2008;6(10):1521-33.
19. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;102:19-65.
20. Stamper IJ, Byrne HM, Owen MR, Maini PK. Modelling the role of angiogenesis and vasculogenesis in solid tumour growth. *Bull Math Biol*. 2007;69(8):2737-72.
21. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
22. Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer*. 2009;125(5):991-5.
23. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18.

24. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5308-16.
25. Yuan X, Dai M, Xu D. Telomere-related Markers for Cancer. *Curr Top Med Chem.* 2020;20(6):410-32.
26. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 1996;56(3):645-50.
27. Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms in cancer: clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6361-74.
28. Feijoo P, Dominguez D, Tusell L, Genesca A. Telomere-dependent genomic integrity: evolution of the fusion-bridge-breakage cycle concept. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6375-85.
29. Santambrogio F, Gandellini P, Cimino-Reale G, Zaffaroni N, Folini M. MicroRNA-dependent regulation of telomere maintenance mechanisms: a field as much unexplored as potentially promising. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6404-21.
30. Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(5):444-56.
31. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100-10.
32. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.
33. Lee M, Hills M, Conomos D, Stutz MD, Dagg RA, Lau LM, et al. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3):1733-46.
34. Crees Z, Girard J, Rios Z, Botting GM, Harrington K, Shearow C, et al. Oligonucleotides and G-quadruplex stabilizers: targeting telomeres and telomerase in cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6422-37.
35. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(19):5402-15.

36. Hwang H, Kreig A, Calvert J, Lormand J, Kwon Y, Daley JM, et al. Telomeric overhang length determines structural dynamics and accessibility to telomerase and ALT-associated proteins. *Structure*. 2014;22(6):842-53.
37. Ribes-Zamora A, Indiviglio SM, Mihalek I, Williams CL, Bertuch AA. TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres. *Cell Rep*. 2013;5(1):194-206.
38. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*. 2000;20(5):1659-68.
39. De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
40. Blackburn EH. Telomerase and Cancer: Kirk A. Landon--AACR prize for basic cancer research lecture. *Mol Cancer Res*. 2005;3(9):477-82.
41. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*. 2019;20(5):299-309.
42. Pfeiffer V, Lingner J. Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a010405.
43. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):133-41.
44. Saretzki G. Telomeres, Telomerase and Ageing. *Subcell Biochem*. 2018;90:221-308.
45. Pereira FdAN. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE EM CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS INDIFERENCIADAS E EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE CAMUNDONGO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; 2008.
46. Shay JW. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(6):584-93.
47. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.



48. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):167-79.
49. Romaniuk A, Kopczynski P, Ksiazek K, Rubis B. Telomerase modulation in therapeutic approach. *Curr Pharm Des*. 2014;20(41):6438-51.
50. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
51. Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(1):98-103.
52. Veverka P, Janovič T, Hofr C. Quantitative Biology of Human Shelterin and Telomerase: Searching for the Weakest Point. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
53. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*. 1998;92(3):401-13.
54. Bejarano L, Schuhmacher AJ, Méndez M, Megías D, Blanco-Aparicio C, Martínez S, et al. Inhibition of TRF1 Telomere Protein Impairs Tumor Initiation and Progression in Glioblastoma Mouse Models and Patient-Derived Xenografts. *Cancer Cell*. 2017;32(5):590-607.e4.
55. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*. 2000;26(4):447-50.
56. Luke-Glaser S, Poschke H, Luke B. Getting in (and out of) the loop: regulating higher order telomere structures. *Front Oncol*. 2012;2:180.
57. Bär C, Blasco MA. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *F1000Res*. 2016;5.
58. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
59. Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*. 2005;309(5738):1253-6.
60. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol*. 2009;27(12):1181-5.

61. Yuan X, Larsson C, Xu D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene*. 2019;38(34):6172-83.
62. Yuan X, Xu D. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) in Action: Cross-Talking with Epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
63. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo j*. 1995;14(17):4240-8.
64. Bryan TM, Reddel RR. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):767-73.
65. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):319-30.
66. Pickett HA, Reddel RR. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(11):875-80.
67. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*. 1991;196(1):33-9.
68. Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol*. 2002;20(7):682-8.
69. Tian X, Chen B, Liu X. Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(5):1460-72.
70. Berei J, Eckburg A, Miliavski E, Anderson AD, Miller RJ, Dein J, et al. Potential Telomere-Related Pharmacological Targets. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(6):458-84.
71. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(6):349-53.
72. Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet*. 2003;362(9388):983-8.
73. Savage SA, Gadalla SM, Chanock SJ. The long and short of telomeres and cancer association studies. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(7):448-9.

74. Thompson CAH, Wong JMY. Non-canonical Functions of Telomerase Reverse Transcriptase: Emerging Roles and Biological Relevance. *Curr Top Med Chem.* 2020;20(6):498-507.
75. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 1998;12(12):1769-74.
76. Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5609-22.
77. Yatabe N, Kyo S, Kondo S, Kanaya T, Wang Z, Maida Y, et al. 2-5A antisense therapy directed against human telomerase RNA inhibits telomerase activity and induces apoptosis without telomere impairment in cervical cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(7):624-30.
78. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science.* 1997;276(5312):561-7.
79. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997;277(5328):955-9.
80. Hukezalie KR, Wong JM. Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *Febs j.* 2013;280(14):3194-204.
81. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science.* 2012;336(6088):1549-54.
82. Zhang Y, Toh L, Lau P, Wang X. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human cancer. *J Biol Chem.* 2012;287(39):32494-511.
83. Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.* 2003;113(7):881-9.
84. Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Björkholm M, Gruber A, et al. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):3826-31.

85. Jin A, Xu J, Wang Y. The role of TERT promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(29):e11548.
86. Zhang X, Li B, Yu J, Dahlström J, Tran AN, Björkholm M, et al. MYC-dependent downregulation of telomerase by FLT3 inhibitors is required for their therapeutic efficacy on acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2018;97(1):63-72.
87. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*. 2004;18(18):2269-82.
88. Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene*. 2000;19(45):5123-33.
89. Wong MS, Wright WE, Shay JW. Alternative splicing regulation of telomerase: a new paradigm? *Trends Genet*. 2014;30(10):430-8.
90. Hrdlicková R, Nehyba J, Bose HR, Jr. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2012;32(21):4283-96.
91. Yi X, White DM, Aisner DL, Baur JA, Wright WE, Shay JW. An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia*. 2000;2(5):433-40.
92. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989;59(3):521-9.
93. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.
94. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
95. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787-91.

96. Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Totoń E, Lisiak N, Hołysz H, Królak A, et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):1401-11.
97. Ségal-Bendirdjian E, Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:332.
98. Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res.* 2008;18(7):725-32.
99. Maida Y, Masutomi K. Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. *Cancer Sci.* 2015;106(11):1486-92.
100. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell.* 2003;114(2):241-53.
101. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol.* 2003;5(5):474-9.
102. Fleisig HB, Wong JM. Telomerase promotes efficient cell cycle kinetics and confers growth advantage to telomerase-negative transformed human cells. *Oncogene.* 2012;31(8):954-65.
103. Kovalenko OA, Caron MJ, Ulema P, Medrano C, Thomas AP, Kimura M, et al. A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell.* 2010;9(2):203-19.
104. Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38540-9.
105. Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene.* 2003;22(1):131-46.
106. Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(23):8222-7.

107. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*. 2002;21(20):3130-8.
108. Li H, Cao Y, Berndt MC, Funder JW, Liu JP. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*. 1999;18(48):6785-94.
109. Chen RJ, Wu PH, Ho CT, Way TD, Pan MH, Chen HM, et al. P53-dependent downregulation of hTERT protein expression and telomerase activity induces senescence in lung cancer cells as a result of pterostilbene treatment. *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e2985.
110. Jin X, Beck S, Sohn YW, Kim JK, Kim SH, Yin J, et al. Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. *Exp Mol Med*. 2010;42(8):574-82.
111. Mandal M, Kumar R. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14183-7.
112. Douarre C, Gomez D, Morjani H, Zahm JM, O'Donohue M F, Eddabra L, et al. Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(7):2192-203.
113. Del Bufalo D, Rizzo A, Trisciuglio D, Cardinali G, Torrisi MR, Zangemeister-Wittke U, et al. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death Differ*. 2005;12(11):1429-38.
114. Jin Y, You L, Kim HJ, Lee HW. Telomerase Reverse Transcriptase Contains a BH3-Like Motif and Interacts with BCL-2 Family Members. *Mol Cells*. 2018;41(7):684-94.
115. Zhang Z, Yu L, Dai G, Xia K, Liu G, Song Q, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes chemoresistance by suppressing cisplatin-dependent apoptosis in osteosarcoma cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):7070.
116. Fleisig HB, Hukezalie KR, Thompson CA, Au-Yeung TT, Ludlow AT, Zhao CR, et al. Telomerase reverse transcriptase expression protects transformed human cells against DNA-damaging agents, and increases tolerance to chromosomal instability. *Oncogene*. 2016;35(2):218-27.

117. Listerman I, Gazzaniga FS, Blackburn EH. An investigation of the effects of the core protein telomerase reverse transcriptase on Wnt signaling in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2014;34(2):280-9.
118. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khattar E, Shin EM, Yan TD, et al. Telomerase directly regulates NF- $\kappa$ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1270-81.
119. Li Y, Zhou QL, Sun W, Chandrasekharan P, Cheng HS, Ying Z, et al. Non-canonical NF- $\kappa$ B signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. *Nat Cell Biol.* 2015;17(10):1327-38.
120. Liu N, Ding D, Hao W, Yang F, Wu X, Wang M, et al. hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(18):8693-703.
121. Liu H, Liu Q, Ge Y, Zhao Q, Zheng X, Zhao Y. hTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. *Sci Rep.* 2016;6:22886.
122. Konieczna N, Romaniuk-Drapała A, Lisiak N, Totoń E, Paszel-Jaworska A, Kaczmarek M, et al. Telomerase Inhibitor TMPyP4 Alters Adhesion and Migration of Breast-Cancer Cells MCF7 and MDA-MB-231. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
123. Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol.* 2009;44(8):485-92.
124. Saretzki G. Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6386-403.
125. Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet.* 2006;15(11):1757-68.
126. Haendeler J, Dröse S, Büchner N, Jakob S, Altschmied J, Goy C, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):929-35.
127. Balasubramaniam M, Reis RJS, Ayyadevara S, Wang X, Ganne A, Khaidakov M. Involvement of tRNAs in replication of human mitochondrial DNA and modifying effects of telomerase. *Mech Ageing Dev.* 2017;166:55-63.

128. Kim H, Yoo JE, Cho JY, Oh BK, Yoon YS, Han HS, et al. Telomere length, TERT and shelterin complex proteins in hepatocellular carcinomas expressing "stemness"-related markers. *J Hepatol.* 2013;59(4):746-52.
129. Augereau A, T'Kint de Roodenbeke C, Simonet T, Bauwens S, Horard B, Callanan M, et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. *Blood.* 2011;118(5):1316-22.
130. Morais KS, Guimarãesb AFR, Ramos DAR, Silva FP, de Oliveira DM. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2017;28(7):750-6.
131. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet.* 2017;49(3):349-57.
132. Zhang A, Wang J, Zheng B, Fang X, Angström T, Liu C, et al. Telomere attrition predominantly occurs in precursor lesions during in vivo carcinogenic process of the uterine cervix. *Oncogene.* 2004;23(44):7441-7.
133. Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2005;7(1):25-37.
134. Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(12):923-36.
135. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 1997;90(4):785-95.
136. Kwok M, Davies N, Agathangelou A, Smith E, Oldreive C, Petermann E, et al. ATR inhibition induces synthetic lethality and overcomes chemoresistance in TP53- or ATM-defective chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2016;127(5):582-95.
137. Batey MA, Zhao Y, Kyle S, Richardson C, Slade A, Martin NM, et al. Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(6):959-67.
138. Brandsma I, Fleuren EDG, Williamson CT, Lord CJ. Directing the use of DDR kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(12):1341-55.



139. Yap TA, Tan DSP, Terbuch A, Caldwell R, Guo C, Goh BC, et al. First-in-Human Trial of the Oral Ataxia Telangiectasia and RAD3-Related (ATR) Inhibitor BAY 1895344 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2020.
140. Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.* 2004;64(24):9152-9.
141. Wojdyla L, Stone AL, Sethakorn N, Uppada SB, Devito JT, Bissonnette M, et al. T-oligo as an anticancer agent in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(2):596-601.
142. Rankin AM, Faller DV, Spanjaard RA. Telomerase inhibitors and 'T-oligo' as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity. *Anticancer Drugs.* 2008;19(4):329-38.
143. Longe HO, Romesser PB, Rankin AM, Faller DV, Eller MS, Gilchrest BA, et al. Telomere homolog oligonucleotides induce apoptosis in malignant but not in normal lymphoid cells: mechanism and therapeutic potential. *Int J Cancer.* 2009;124(2):473-82.
144. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, et al. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res.* 2014;74(15):4145-56.
145. Gandhi NS, Tekade RK, Chougule MB. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: current progress and advances. *J Control Release.* 2014;194:238-56.
146. Nguyen DD, Chang S. Development of Novel Therapeutic Agents by Inhibition of Oncogenic MicroRNAs. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1).
147. García-Beccaria M, Martínez P, Méndez-Pertuz M, Martínez S, Blanco-Aparicio C, Cañamero M, et al. Therapeutic inhibition of TRF1 impairs the growth of p53-deficient K-RasG12V-induced lung cancer by induction of telomeric DNA damage. *EMBO Mol Med.* 2015;7(7):930-49.
148. Yang D, Okamoto K. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med Chem.* 2010;2(4):619-46.

149. Xu CX, Liu LY, Lv B, Zhao HY, Cao Q, Zhai T, et al. Two novel fan-shaped trinuclear Pt(II) complexes act as G-quadruplex binders and telomerase inhibitors. *Dalton Trans.* 2020;49(27):9322-9.
150. Saraswati AP, Relitti N, Brindisi M, Gemma S, Zisterer D, Butini S, et al. Raising the bar in anticancer therapy: recent advances in, and perspectives on, telomerase inhibitors. *Drug Discov Today.* 2019;24(7):1370-88.
151. Sugarman ET, Zhang G, Shay JW. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. *Mol Carcinog.* 2019;58(9):1581-8.
152. Mizukoshi E, Kaneko S. Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
153. Inderberg-Suso EM, Trachsel S, Lislrud K, Rasmussen AM, Gaudernack G. Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001. *Oncoimmunology.* 2012;1(5):670-86.
154. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, et al. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene.* 2006;25(42):5719-25.
155. Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, et al. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.* 2005;65(4):1489-96.
156. Gunaratnam M, Greciano O, Martins C, Reszka AP, Schultes CM, Morjani H, et al. Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(5):679-89.
157. Gowan SM, Heald R, Stevens MF, Kelland LR. Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol.* 2001;60(5):981-8.
158. Gowan SM, Harrison JR, Patterson L, Valenti M, Read MA, Neidle S, et al. A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol.* 2002;61(5):1154-62.

159. Zhou G, Liu X, Li Y, Xu S, Ma C, Wu X, et al. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(12):14925-39.
160. Miyazaki T, Pan Y, Joshi K, Purohit D, Hu B, Demir H, et al. Telomestatin impairs glioma stem cell survival and growth through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1268-80.
161. Sullivan HJ, Readmond C, Radicella C, Persad V, Fasano TJ, Wu C. Binding of Telomestatin, TMPyP4, BSU6037, and BRACO19 to a Telomeric G-Quadruplex-Duplex Hybrid Probed by All-Atom Molecular Dynamics Simulations with Explicit Solvent. *ACS Omega*. 2018;3(11):14788-806.
162. Zhao L, Wink M. The  $\beta$ -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. *PeerJ*. 2013;1:e174.
163. Burchett KM, Yan Y, Ouellette MM. Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e85155.
164. Frink RE, Peyton M, Schiller JH, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD. Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner. *Oncotarget*. 2016;7(22):31639-51.
165. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med*. 2016;8(1):69.
166. Relitti N, Saraswati AP, Federico S, Khan T, Brindisi M, Zisterer D, et al. Telomerase-based Cancer Therapeutics: A Review on their Clinical Trials. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(6):433-57.
167. El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF, Martens UM. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood*. 2005;105(4):1742-9.

168. Bashash D, Zareii M, Safaroghli-Azar A, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Hematology*. 2017;22(6):330-40.
169. Shi Y, Sun L, Chen G, Zheng D, Li L, Wei W. A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. *Target Oncol*. 2015;10(4):565-73.
170. Mender I, Gryaznov S, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Cancer Discov*. 2015;5(1):82-95.
171. Mender I, Gryaznov S, Shay JW. A novel telomerase substrate precursor rapidly induces telomere dysfunction in telomerase positive cancer cells but not telomerase silent normal cells. *Oncoscience*. 2015;2(8):693-5.
172. Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, et al. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(9):657-65.
173. Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer*. 2011;10:96.
174. Gurung RL, Lim HK, Venkatesan S, Lee PS, Hande MP. Targeting DNA-PKcs and telomerase in brain tumour cells. *Mol Cancer*. 2014;13:232.
175. Morais KDS, Arcanjo DDS, de Faria Lopes GP, da Silva GG, da Mota THA, Gabriel TR, et al. Long-term in vitro treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells. *Cell Biochem Funct*. 2019;37(4):273-80.
176. Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF- $\kappa$ B pathway. *Tumour Biol*. 2015;36(11):8425-37.
177. Ghasemimehr N, Farsinejad A, Mirzaee Khalilabadi R, Yazdani Z, Fatemi A. The telomerase inhibitor MST-312 synergistically enhances the apoptotic effect of

doxorubicin in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1742-50.

178. Ameri Z, Ghiasi S, Farsinejad A, Hassanshahi G, Ehsan M, Fatemi A. Telomerase inhibitor MST-312 induces apoptosis of multiple myeloma cells and down-regulation of anti-apoptotic, proliferative and inflammatory genes. *Life Sci.* 2019;228:66-71.

179. Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K. The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:57-71.

180. Gillet JP, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(2):237-62.

181. Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat.* 2016;26:1-9.

182. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-66.

183. Liu X. ABC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1141:13-100.

184. Domenichini A, Adamska A, Falasca M. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(1):52-60.

185. Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 2011;286(9):6979-88.

186. Henderson MJ, Haber M, Porro A, Munoz MA, Iraci N, Xue C, et al. ABCC multidrug transporters in childhood neuroblastoma: clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(16):1236-51.

187. Assaraf YG, Brozovic A, Gonçalves AC, Jurkovicova D, Linē A, Machuqueiro M, et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2019;46:100645.

188. Dean M. The Genetics of ATP-Binding Cassette Transporters. *Methods in Enzymology*. 400: Academic Press; 2005. p. 409-29.
189. Zinzi L, Capparelli E, Cantore M, Contino M, Leopoldo M, Colabufo NA. Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR. *Front Oncol*. 2014;4:2.
190. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62.
191. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992;258(5088):1650-4.
192. Deeley RG, Cole SP. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett*. 2006;580(4):1103-11.
193. Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(8):438-46.
194. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15665-70.
195. Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*. 2002;13(16):2059-63.
196. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275-92.
197. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):714-26.
198. Lippert TH, Ruoff HJ, Volm M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung*. 2008;58(6):261-4.
199. Alfarouk KO, Stock C-M, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*. 2015;15(1):71.

200. Alaoui-Jamali MA, Dupré I, Qiang H. Prediction of drug sensitivity and drug resistance in cancer by transcriptional and proteomic profiling. *Drug Resist Updat.* 2004;7(4-5):245-55.
201. Gong J, Jaiswal R, Mathys JM, Combes V, Grau GE, Bebawy M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(3):226-34.
202. Peetla C, Vijayaraghavalu S, Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(13-14):1686-98.
203. Mattern J. Drug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Anticancer Res.* 2003;23(2c):1769-72.
204. Mender I, LaRanger R, Luitel K, Peyton M, Girard L, Lai TP, et al. Telomerase-Mediated Strategy for Overcoming Non-Small Cell Lung Cancer Targeted Therapy and Chemotherapy Resistance. *Neoplasia.* 2018;20(8):826-37.
205. Kyte JA, Gaudernack G, Dueland S, Trachsel S, Julsrud L, Aamdal S. Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4568-80.
206. Morais KdS. Dissertação de Mestrado: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO IN VITRO DE INIBIDOR DE TELOMERASE MST-312 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.: UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA; 2016.
207. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest.* 2014;124(2):617-30.
208. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009;57(6):435-45.
209. Al-Malky HS, Al Harthi SE, Osman AM. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract.* 2020;26(2):434-44.
210. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu PP. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz.* 2011;36(4):296-305.

211. da Silva JL, Cardoso Nunes NC, Izetti P, de Mesquita GG, de Melo AC. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;145:102855.
212. Gurung RL, Lim SN, Low GK, Hande MP. MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2014;7(4-6):283-98.
213. Dong X, Liu A, Zer C, Feng J, Zhen Z, Yang M, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2009;9:133.
214. Chung SS, Oliva B, Dwabe S, Vadgama JV. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST-312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. *Int J Oncol*. 2016;49(2):487-98.
215. Tamakawa RA, Fleisig HB, Wong JM. Telomerase inhibition potentiates the effects of genotoxic agents in breast and colorectal cancer cells in a cell cycle-specific manner. *Cancer Res*. 2010;70(21):8684-94.
216. VILLARINHO NJ. Dissertação de Mestrado: PAPEL DA INIBIÇÃO DA TELOMERASE NA RESISTÊNCIA MULTIFATORIAL EM LINHAGEM HUMANA DE CARCINOMA DE PULMÃO H460: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO; 2020.
217. GARNIQUE ADMB. Tese de Doutorado: EFEITO DE INIBIDORES DE TELOMERASE SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO HUMANO E SOBRE CÉLULAS IMRTALIZADAS COM hTERT: Universidade de São Paulo; 2017.
218. Begicevic RR, Falasca M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
219. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016;370(1):153-64.
220. Kuo MT, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee YC, Tatebe S, Mills GB, et al. Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling. *Oncogene*. 2002;21(13):1945-54.



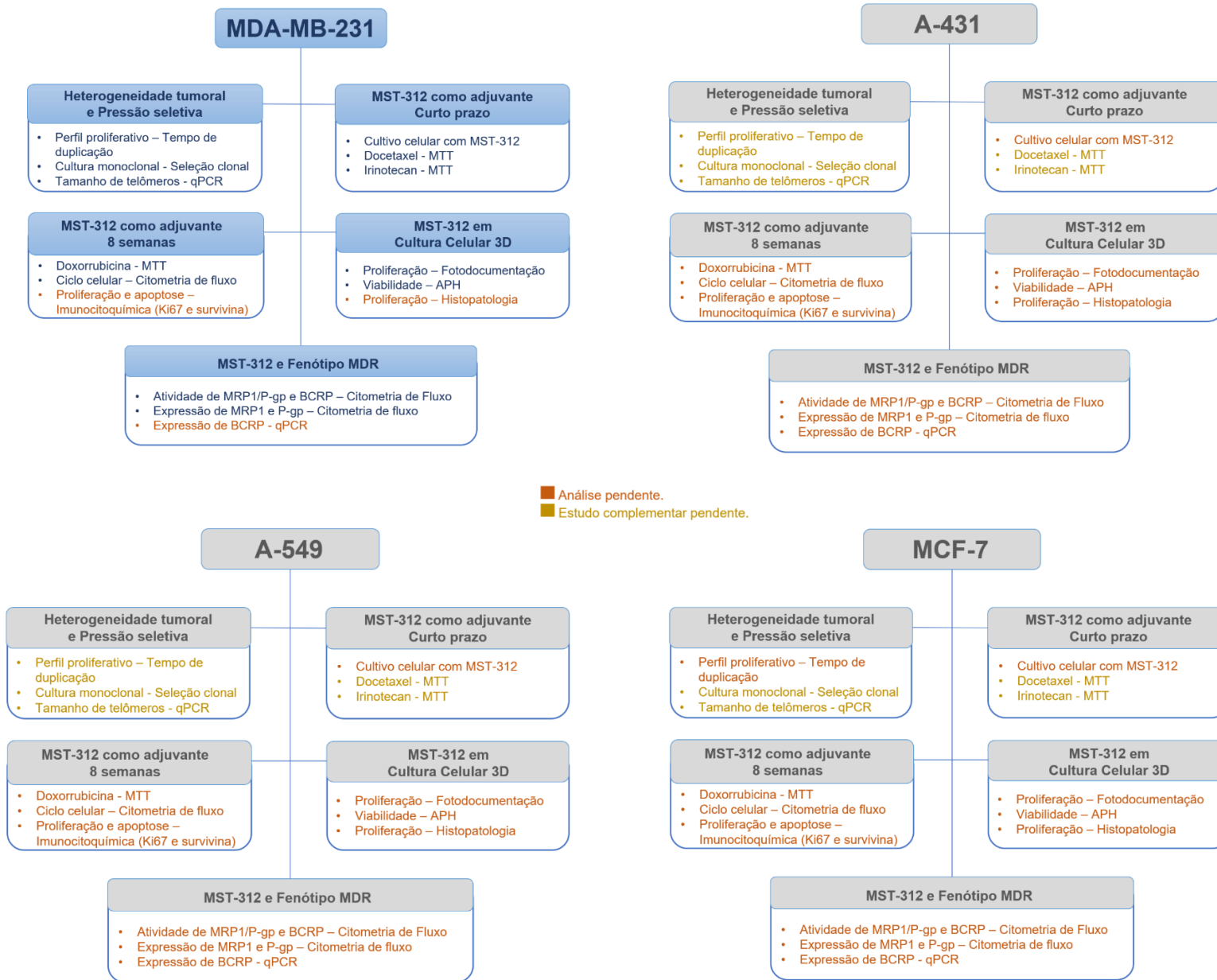
221. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009;460(7251):66-72.
222. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet*. 2008;4(1):e10.
223. Zhang ZM, Wu JF, Luo QC, Liu QF, Wu QW, Ye GD, et al. Pygo2 activates MDR1 expression and mediates chemoresistance in breast cancer via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncogene*. 2016;35(36):4787-97.
224. Martin-Orozco E, Sanchez-Fernandez A, Ortiz-Parra I, Ayala-San Nicolas M. WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front Immunol*. 2019;10:2854.
225. Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer*. 2020;19(1):165.
226. Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(5):447-62.
227. Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- $\kappa$ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br J Pharmacol*. 2011;162(5):1096-108.
228. Seelig A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front Oncol*. 2020;10:576559.
229. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol*. 2020;11:589929.
230. Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, Tai YT, Mitsiades CS, Mitsiades N, et al. Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res*. 2003;63(1):18-21.
231. Ding D, Zhou J, Wang M, Cong YS. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *Febs j*. 2013;280(14):3205-11.

232. Koh CM, Khattar E, Leow SC, Liu CY, Muller J, Ang WX, et al. Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity. *J Clin Invest.* 2015;125(5):2109-22.
233. Kang KW, Im YB, Go WJ, Han HK. C-myc amplification altered the gene expression of ABC- and SLC-transporters in human breast epithelial cells. *Mol Pharm.* 2009;6(2):627-33.
234. Porro A, Iraci N, Soverini S, Diolaiti D, Gherardi S, Terragna C, et al. c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Mol Cancer Res.* 2011;9(8):1054-66.
235. Wang Z, Xu Y, Meng X, Watari F, Liu H, Chen X. Suppression of c-Myc is involved in multi-walled carbon nanotubes' down-regulation of ATP-binding cassette transporters in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;282(1):42-51.

## **ANEXO I**

# ANEXO I – Desenho Experimental Original

Ensaio em azul estão descritos neste trabalho; em cinza, os ensaios já realizados e em fase de análise ou que necessitam de estudos complementares.



## **ANEXO II**

## REVIEW ARTICLE

# Clinical Relevance of Alternative Lengthening of Telomeres in Cancer

Guilherme G. da Silva<sup>1,#</sup>, Karollyne S. Morais<sup>2,#</sup>, Daniel S. Arcanjo<sup>1</sup> and Diêgo M. de Oliveira<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Basis of Health Sciences, University of Brasilia, Ceilândia Campus, Federal District, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, University of Brasilia, Federal District, Brazil

**Abstract:** The alternative lengthening of telomere (ALT) is a pathway responsible for cell immortalization in some kinds of tumors. Since the first description of ALT is relatively recent in the oncology field, its mechanism remains elusive, but recent works address ALT-related proteins or cellular structures as potential druggable targets for more specific and efficient antitumor therapies. Moreover, some new generation compounds for antitelomerase therapy in cancer were able to provoke acquisition of ALT phenotype in treated tumors, enhancing the importance of studies on this alternative lengthening of the telomere. However, ALT has been implicated in different – sometimes opposite – outcomes, according to the tumor type studied. Then, in order to design and develop new drugs for ALT+ cancer in an effective way, it is crucial to understand its clinical implications. In this review, we gathered works published in the last two decades to highlight the clinical relevance of ALT on oncology.

## ARTICLE HISTORY

Received: September 29, 2019  
Revised: December 11, 2019  
Accepted: December 16, 2019

DOI:  
10.2174/1568026620666200110112854

**Keywords:** ALT, Cancer, Telomeres, Telomerase, Cell immortalization, Oncology.

## 1. INTRODUCTION

Normal cells have their proliferative potential carefully regulated. To become oncogenic, a cell needs to achieve autonomous and constant proliferation, so it must pass through the immortalization process [1, 2]. The telomeres are key structures to this process; they get shorter after each cell cycle, limiting its proliferative capacity under normal conditions by leading to senescence or crisis [3, 4, 5, 6]. It is known that the enzyme telomerase has a central role in telomere maintenance in cancer; in fact, 85-90% of tumors from several different kinds express it. However, some tumors (10-15%) do not exhibit notable telomerase expression; instead, they undergo alternatives telomere maintenance mechanisms collectively known as "alternative lengthening of telomere" or ALT [7, 8, 9, 10, 11]. Many groups have been studying this pathway since its first description, but the heterogeneity of ALT characteristics in different tumors supports the existence of a variety of mechanisms for the telomerase independent telomere maintenance [12].

The first report of telomere lengthening in a negative telomerase cell was made in 1994 by John Murnane and coworkers [13]. In 1996, Henderson *et al.* suggested a telomerase independent telomere length maintenance mechanism by analyzing telomerase negative human diploid fibroblasts (HDFs) under fluorescence in situ hybridization (FISH) and confocal microscopy [14]. In 1997, the event began to be described and named ALT when Bryan and coworkers found

that one in four cell lines studied did not have telomerase activity but could keep longer and more heterogeneous telomeres (by Terminal Restriction Fragment – TRF – analyzes) [8].

The regulation of ALT mechanism in cancer cells remains not completely elucidated, and then many works addressing different aspects of ALT-positive cells have been conducted aiming - in most cases - new effective and selective therapeutic targets [12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Some studies approaching clinical aspects of ALT tumors have also been conducted in the last years, they are crucial to support the development of new molecules for clinical use. Nevertheless, whereas ALT is a relatively new issue in oncology, the data about the impact of this cell process on clinical outcome or prognosis are diffuse and sometimes contradictory. In this review, we gathered works published in the last two decades to highlight the clinical relevance of ALT on oncology.

## 2. ALT-ASSOCIATED SIGNALS AND MARKERS USED IN CLINICAL SAMPLES

Beyond longer and more heterogeneous telomeres, other molecular characteristics have been attributed to ALT cells. In 1999, APB (ALT-associated promyelocytic leukemia body or PML-Body) was described as a nuclear structure containing PML protein, telomeric DNA, replication factors, hTRF1, hTRF2 and proteins for recombination and synthesis of DNA; those structures were much more frequent in cells in which alternative telomere elongation was detected [24, 25, 26]. Thus, APBs were after that taken as ALT markers. Several studies have tried to describe the functions of APBs, which seems to act on extrachromosomal DNA sequestra-

\*Address correspondence to this author at the Department of Biological Basis of Health Sciences, University of Brasilia, Ceilândia Campus, P.O. Box: 72220-275, Brasilia, Federal District, Brazil; Tel: +1-61-3107-1998; E-mails: [dmaureira@unb.br](mailto:dmaureira@unb.br), [diego.madureira@pq.cnpq.br](mailto:diego.madureira@pq.cnpq.br)

<sup>#</sup>These authors equally contributed to the work.

tion, working on the telomeres elongation dynamic with additional implications on cell cycle arrest and senescence [24, 27, 28]. Nevertheless, over time, new pieces of evidence showed that it is not universal, neither specific marker [29].

Numerous papers have described the importance of homologous recombination and DNA double-strand breaks (DSBs) in ALT phenotypes [30, 31, 32]. Dunham (2000) demonstrated that portions inserted into telomeres of ALT positive cells were copied to other telomeres; this was not observed in cells immortalized by telomerase reactivation [33]. This genomic instability is closely related to the amount of extrachromosomal telomeric DNA, which assumes single-strand circular fragments generally rich in cytosine (C-circles) or guanine (G-circles), or double-stranded circular fragments with telomeric sequence [34, 35, 36, 37]. Then, the C-circle assay (CCA) was described by Henson *et al.* in 2009 as a satisfactory technique for detecting the alternative lengthening of telomeres, and C-circles joined the list of ALT markers [36, 37, 38, 39].

Currently, it is well known that some factors constitute the ALT phenotype (telomere elongation in the absence of telomerase), such as the presence of homologous recombination between the chromatids; high levels of heterogeneity in telomere length and presence of and C-circles/G-circles and APBs. Some works also implicate high frequency of specific mutations, as observed in ATRX and DAXX genes; as well as extrachromosomal telomeric DNA repeats, TERRA (telomeric repeat-containing RNA) and high level of G-quadruplexes DNA, as ALT associated features [12, 40, 41, 42, 43, 44].

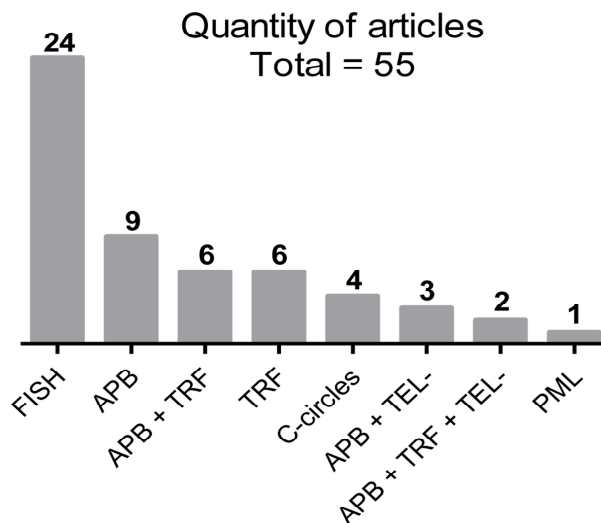
Briefly, despite all the knowledge accumulated over the time since first ALT descriptions, there is no consensus about the most suitable marker, and a specific marker for use on the clinical approach has not been described yet. As result of this scenario, the criteria for ALT classification on tumor samples range from the presence of PML only [45] to multiple molecular markers in combination [46, 47]; but APBs (alone or in combination with other signals) and ultra-bright telomere FISH signals (ALT-associated telomeric foci observed under FISH) remains the most used ALT markers (Fig. 1). Telomere length and heterogeneity accessed by Telomere Restriction Fragment analysis (TRF) is also frequently used in studies with clinical samples [48].

The absence of a standard methodology for ALT detection leads to obvious bias in comparing all these different works; despite this difficulty, we grouped the most relevant data to give an overview of the theme.

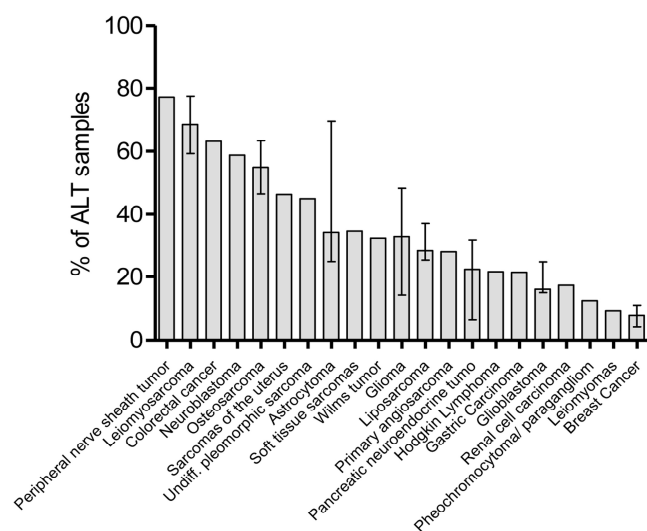
### 3. CLINICAL RELEVANCE OF ALT IN CANCER

ALT-positive cases are certainly more frequent among the tumors of mesenchymal origin (those arising from bone, soft tissues and nervous system), but there is no pattern among them, what indicates different prognosis according to the tumor type or subtype [17, 49, 50, 51, 52]. ALT is associated with an increased risk of death in patients with sarcoma [53], for instance; but on the other hand, it is associated with the best overall patient survival independent of patient age, extent of surgery, treatment received, and *IDH1* mutant status for glioblastoma patients [54] (Table 1). Fur-

thermore, although ALT is more prevalent in soft tissue sarcomas and central nervous system, it was already identified in many other kinds of cancer, such as liver, skin, testis, lung and bladder tumors [55] (Fig. 2). Therefore, studies aiming for the development of new drugs or identification of drugable targets in ALT tumors must consider the type of cancer these new drugs would be suitable for.



**Fig. (1).** Markers/assays used in 55 works to classify a sample as ALT+ (Reviews and papers that do not give details about criteria for ALT classification were not included). FISH: Fluorescence in situ hybridization, APB: ALT-associated PML bodies (*PML: Promyelocytic leukemia*), TRF: Terminal Restriction Fragment, C-circles: single-strand circular DNA fragments rich in cytosine, TEL-: Absence of telomerase expression or activity. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).



**Fig. (2).** Percentage of ALT+ tumors for different types of cancer. Data are presented as median and range for those evaluated in more than one work (Reviews and papers with N < 30 were not included). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Next, we will summarize the most relevant findings in this area by grouping data available according to the kind of

**Table 1.** Clinical relevance of ALT markers in different types of cancer.

Type of tumor	Clinical relevance	Reference
Glioma	Associated with loss of ATRX (prognostic factor)	[57] [61] [62] [73] [143]
Glioblastoma	Associated with longer survival	[46] [48] [65] [66]
Liposarcoma	Associated with reduced overall survival	[96] [97] [98] [101]
Leiomyosarcoma	Associated with deletions of <i>RBL2</i> and poor clinical outcome	[113] [116]
Pancreatic neuroendocrine tumors	Associated with higher grade and size, shorter recurrence-free survival, loss of ATRX and liver metastasis	[86] [88] [91] [92] [93] [94]
Malignant fibrous histiocytoma of bone	Associated with poor prognosis	[108]
Renal cell carcinoma	Associated with high stage	[47]
Neuroblastoma	Associated (+hTERT) with reduced overall survival	[80]
Hodgkin Lymphoma	Correlated with overall survival and event-free survival in EBV+ patients	[112]
Sarcomas of the uterus	Associated with poor prognosis	[117]
Undifferentiated pleomorphic sarcomas	Associated with loss of ATRX	[52]

The table summarizes the associations between ALT and clinical features with the strongest evidence (number of concordant works, the number of samples analyzed, and strict criteria for ALT+ classification).

tumor. Tumors with single ALT-related published data and works with small cohorts or ALT as secondary finding was grouped in the subsection “Other tumors”.

### 3.1. Glioma

Gliomas are the most frequent primary brain tumors [56], and ALT was correlated with many molecular markers and prognostic factors, such as IDH1 mutation and ATRX protein loss [57], which was demonstrated to facilitate the alternative mechanism of telomere maintenance in cancer cells [58]. ALT is especially correlated with mutations/loss in ATRX (Table 2), which is a well-known favorable prognostic marker for this kind of cancer [59]. The loss of ATRX is common in secondary glioblastomas (57%), oligoastrocytomas (68%), and grade II-III astrocytomas (71%) [60]. Nevertheless, mutations in ATRX were not significantly associated with ALT activity across all nervous system tumors [43], but only in high-grade astrocytomas in both pediatric and adult patients [61, 62, 63], and it was also found to be more frequent in metastatic than non-metastatic primary pediatric medulloblastoma [64].

The presence of ALT markers themselves has been strongly associated with increased survival of patients with high-grade gliomas [46, 65, 66, 67]. Median survival for patients with ALT- and ALT+ glioblastoma was found to be 247 and 542 days, respectively [48]. Also, Mangerel *et al.* showed one year of overall survival of  $63 \pm 12$  and  $23 \pm 10\%$  for ALT positive and negative tumors, respectively [63] (Table 1). Additionally, Fogli *et al.* (2017) suggested a correlation between elevated levels of telomerase retaining RNAs (TERRA) and increased survival in human malignant gliomas [68]. On the other hand, TERRA level in astrocytoma WHO grade 2 to 4 correlated with advanced clinical grade and telomere length, but also with telomerase activity, indicating non-ALT samples [69]; also, the overall survival was significantly decreased for patients with ALT-positive NF1-associated gliomas [70], what seems to be an exception for

the role of ALT as prognostic factor for these tumors. The neurofibromatosis type 1 (NF1) is a condition that predisposes patients to a variety of neoplasms.

In pediatric patients, the ALT cells were also related to TP53 mutation [63], following previous data suggesting that the poor performance of p53 could partially be explained by the activation of the alternative telomere elongation in glioma [46, 71].

Recent reports associate histone H3 mutations to alternative lengthening of telomeres [72]. H3-K27M mutations and ATRX loss, for example, may indicate that pilocytic astrocytoma is most likely to aggressively or develop anaplastic change [73]. In addition, epigenetic mechanisms seem to be involved in the regulation of ALT, pointing to new possible therapeutic targets in glioma [74].

ALT phenotype was also described in glioma stem cells [75] and associated with immune signatures of tumor-associated macrophages [76]. Many studies with clinical samples have listed new potential targets in ALT+ and ALT-tumors; the survival function of paired box transcription factor 8 (PAX8), for instance, was showed to be absent in normal brain tissue, and present in 80% of telomerase positive and 73% of non-defined telomere maintenance gliomas, but only 44% of ALT gliomas [77].

### 3.2. Neuroblastoma

Neuroblastoma is the most common solid tumor in children, and its prevalence decreases as age increases [78]. Importantly, it is also the pediatric tumor most frequently accessed by studies on telomere biology [79]. In a study with 102 samples of neuroblastoma, the simultaneous high hTERT expression and ALT positivity were associated with significantly reduced overall survival [80]. Previously, Onitake *et al.* (2009) found an association between ALT positivity and unfavorable prognosis, including chemo-resistance, in neuroblastomas. In this study, the TRF was used to determine positive samples [81].



Table 2. Frequency of ALT+ samples in different types of tumor.

Type of tumor	ALT+ / Total samples	Referencies / Details
Glioma	14/29 A	[62] Associated with loss of ATRX
	11/50 D	[63] Associated with TP53 mutant
	9/63 D	[68] Associated with TERRA
	10/26 A	[70] Associated with diffuse/high-grade gliomas
	23/70 A	[70] Associated with high-grade
	3/30 C	[144] Telomerase+ ALT+ tumors identified in pediatric tumors
Astrocytoma	53/214 A	[61] Associated with loss of ATRX
	17/50 B, C	[65]
	40/116 A	[57] Different frequencies according to histologic subtype
	25/36 A	[73] Associated with loss of ATRX and H3-K27M mutations
Neuroblastoma	60/102 A	[80] Telomerase+ ALT+ tumors identified
Glioblastoma	26/164 B	[54] Related to tumor-associated macrophages IDH1/IDH2 mutations
	18/110 B, C, E	[46] Associated with p53 mutation
	19/77 C	[48] Telomerase+ ALT+ tumors identified
	86/573 B	[66] Associated with less aggressive tumors
Pancreatic neuroendocrine tumors	3/47 A	[85] Also found in lymph node metastases (2/10)
	98/321 A	[89] Shorter disease-free survival
	15/65 A	[90] Associated with loss of DAXX and ATRX and poor prognosis
	18/83 A	[91] Correlated with relapse in non-functional tumors
	56/269 A	[88] Associated with poor prognosis
	10/327 A	[87] Associated with aggressive pathological factors
	27/85 A	[94] Associated with liver metastases
Liposarcoma	10/27 B, E	[96] Associated with poor prognosis
	36/139 B	[98] Associated with poor prognosis
	27/85 B	[101] Associated with poor prognosis
	24/85 C	[101] Associated with poor prognosis
	23/91 A	[97] Associated with poor prognosis
Breast carcinoma	3/71 B	[121] Associated with HER-2 overexpression
	10/90 F	[45] APB were not accessed
Medulloblastoma	15/60 A	[64] More frequent in metastatic tumors
Osteosarcoma	27/58 B, C	[65] Intratumoral heterogeneity described
	38/60 C	[105] Telomerase+ ALT+ tumors identified
Soft tissue sarcomas	35/101 B, C	[65] Many subtypes of tumors evaluated
Histiocytoma of bone	5/10 C	[108] Malignant fibrous histiocytoma of bone
Ewing's sarcoma	0/30 C	[104]
Renal cell carcinoma	12/69 B, C, E	[47]
Wilms tumor	11/34 B, C	[120] Telomerase + ALT+ tumors identified
Hepatic angiosarcomas	17/61 A	[130] Found only in primary tumors
	8/12 A	[130]
Colorectal cancer	12/19 D	[122]
Medullary thyroid carcinoma	6/19 B, E	[135] Telomerase had more clinical relevance
Gastric carcinoma	9/42 B, E	[127] Related to deficiency in mismatch repair system
Adrenocortical carcinoma	1/22 B, C	[124] Telomerase+ ALT+ tumors identified
Leiomyomas	13/142 A	[118] Associated with ATRX/DAXX
Leiomyosarcoma	51/86 A	[113] Associated with poor prognosis
	51/86 A	[52] Associated with aggressiveness/poor outcome
	38/49 D	[116] Associated with deletions of <i>RBL2</i>
Neuroendocrine lung tumors	0/86 B	[95]
Sarcomas of the uterus	19/41 B	[117] Associated with poor prognosis
Malignant nerve sheath tumors	44/57 B, C	[137] Telomerase + ALT+ tumors identified
	9/75 A	[70] The neurofibromatosis type 1-associated tumors
Hepatocellular carcinoma	11/12 A	[134] Chromophobe hepatocellular carcinoma with anaplasia
Pheochromocytoma/ paraganglioma	25/200 B	[129] Associated with high-risk of metastatic progression
Hodgkin lymphoma	8/37 B	[112] Associated with poor event-free survival
Pleomorphic sarcomas	138/308 A	[52] (undifferentiated) Associated with loss of ATRX
Several types	228/6110 A	[103] Different frequencies according to tumor type

Assay/marker for ALT+ classification: A - ultra-bright telomere FISH signals; B - APB; C - TRF (telomere length); D - C-circle assay; E - absence of telomerase expression/activity; F - PML only.

ATRX mutation is also a high-risk neuroblastoma biomarker [82], and then some works have tried to figure out any association between that marker and ALT phenotype. However, since the frequency of ALT in neuroblastoma is not as high as in gliomas, the evidence showing a possible correlation of it to ATRX alterations is still weak [83, 84].

### 3.3. Neuroendocrine Tumors

For neuroendocrine tumors, ALT is associated with the loss of ATRX expression as well, and it indicated decreasing in relapse-free survival and tumor-specific survival in both pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [85, 86, 87, 88]. Moreover, the prevalence of ALT and DAXX/ATRX loss correlated with larger tumor size, higher grade WHO (according to the 2010 World Health Organization grading for the pancreatic neuroendocrine neoplasms), lymph node metastasis, distant metastasis, shorter disease-free survival [88, 89] and a poor prognosis in patients with primary tumor [90]. Additionally, ALT, as well as the absence of PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1), was correlated with the relapse of non-functional (do not produce excess hormones) pancreatic neuroendocrine tumors [91].

Alternative lengthening of telomeres was found in PNETs measuring more than 3cm and lymph node metastases, suggesting that it is a late event in these tumors development, and it was associated with loss of ATRX too [85, 92]. In fact, it has been proposed as a biomarker of pancreatic origin in neuroendocrine tumor liver metastases [93] and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [87]. ALT-positivity was independently associated with liver metastases with an OR (*Odds Ratio*) of 3.486 [94]. Also, in a Korean cohort of 269 surgically resected primary pancreatic neuroendocrine neoplasms, ALT was associated with lymphovascular and perineural invasion and distant metastases [88] (Table 1).

In neuroendocrine lung tumors, ALT was not detected by the APB assay, but the absence of telomerase activity was supposed to contribute to a favorable prognosis [95].

### 3.4. Liposarcoma

ALT phenotype was described as a strong predictor of poor prognosis in liposarcoma [96], mainly in dedifferentiated liposarcomas [97]. It is a strong prognostic discriminant of increased mortality even when adjusted for tumor location, grade, and histology [98].

The ALT positive tumors usually represent 25-37% of liposarcoma samples [96, 98]. It is important to say that most studies have used only the presence of APBs as ALT positive marker, but the presence of other ALT-associated features in liposarcomas without APBs indicates that incidence of ALT in these tumors should be under-estimated [99, 100]. In this sense, Venturini and co-workers compared two methods for ALT detection in liposarcomas (APB vs. TRF), which showed similar efficiency; moreover, the association between ALT and increased mortality remains clear no matter the methodology used [101].

### 3.5. Osteosarcoma

Despite the ALT mechanism is frequently found in osteosarcomas (Fig. 2), it has not been identified in Ewing's sarcomas [65, 102, 103, 104]. Some data suggest that the absence of telomerase expression or undetectable telomere maintenance mechanism predicts a favorable outcome on this kind of cancer [105, 106]. In addition, the absence of telomerase activity was associated with longer survival of patients with osteosarcoma or Ewing's sarcoma according to Sotillo-Piñeiro *et al.* [107], but another study shows no difference in clinical outcomes when telomerase positive osteosarcoma samples were compared to ALT positive samples [105]; this lack of influence of ALT in outcome of osteosarcomas was ratified in Hanson's study [65]. However, ALT was found to be present in 5 out of the 10 patients with the rare malignant fibrous histiocytoma of bone (Table 2), and it was associated with poor prognosis [108].

### 3.6. Leukemia and Lymphoma

It is well established that telomerase plays a central role in hematological diseases [109, 110], then ALT has been taken as a secondary actor on leukemia, but some works highlight the occurrence of alternative mechanisms of telomere maintenance. For instance, telomeric sister chromatid Exchange (T-SCE) was more frequent in chronic lymphocytic leukemia B cells compared with normal leukocytes, but C-circles (ALT hallmark) were not found in these cells [111]. However, Samassekou *et al.* found C-circles in 3 of 24 chronic myeloid leukemia (CML) samples. In the same work, 12 cells were telomerase negative, and 11 presented ECTR (circular extra-chromosomal telomeric repeats), indicating that ALT may be involved in the early stages of leukemogenesis [38]. More significantly, in EBV (Epstein-Barr virus) positive patients with Hodgkin Lymphoma, there was a significant correlation between both overall and event-free survival and the presence of an ALT profile in lymph nodes [112].

### 3.7. Leiomyosarcoma and Uterine Tumors

ALT was also associated with loss of ATRX expression and deletions of **RBL2** in leiomyosarcoma, including uterine leiomyosarcoma. In these tumors, the alternative lengthening of telomeres acts as a predictor factor of aggressive histologic features and poor clinical outcome [113, 114, 115, 116]. In Sarcomas of the uterus, APBs were detected in 46,3% of samples, but only 36,4% were positive to the C-circle assay for confirmation of the ALT phenotype. The APB positive cases were associated with high-grade tumors, mitotic index, tumor size, and poor prognosis with reduced disease-free survival [117] (Table 1). In addition, Ahvenainen *et al.* indicate that some subtype of uterine leiomyoma may harbor long-term malignant potential associated with ALT expression and loss ATRX / DAXX. [118].

### 3.8. Renal Tumors

In 1999, Müller *et al.* demonstrated that the proportion of cells with active telomerase was smaller in samples with a slow-growing phenotype in renal tumors [119]. After that,

ALT was already detected and related to high stage tumors in Wilms Tumors [120] and renal cell carcinoma [47].

### 3.9. Breast Cancer

There are a few studies on ALT with clinical samples of breast tumors, but it was already demonstrated its association with HER-2 overexpression. However, its prognostic value is still unknown in this kind of cancer [45, 121].

### 3.10. Colorectal Cancer

In samples of colorectal cancer, ALT was positively associated with chromosomal stability [122] and was also found to indicate a malignant potential of polyps, whereas it was more frequent in cancer-adjacent polyps than cancer-free polyps [123].

### 3.11. Other Tumors

ALT markers were present in samples from adrenocortical carcinoma [124]; gastrointestinal tumors [125, 126], in which it was associated with deficiency in mismatch repair system [127]; and rhabdomyosarcoma, in which it was more frequent in embryonal type [128]; but it was not able to predict any outcome in these cases. On the other hand, the telomere elongation mechanism and ATRX mutations were able to indicate high-risk of metastatic progression in pheochromocytoma and paraganglioma tumors [129]. Moreover, ALT was suggested as an important telomere maintenance mechanism in primary, but not secondary, angiosarcomas, and was also associated with the loss of ATRX expression in those tumors [130] (Table 2). More importantly, ALT was associated with worse event-free survival of patients with angiosarcoma [131].

ALT failed to significantly predict clinical outcome in diffuse malignant peritoneal mesothelioma [132], and it was not found at all in malignant pleural mesothelioma samples tried by C-circle assay [133]. In 2013, Wood and collaborators showed that the ALT phenotype was present in 8% of chromophobe hepatocellular carcinoma samples and 92% of the abrupt anaplasia subtype [134]. ALT was also identified in medullary thyroid carcinoma, but in this case, telomerase activation was found to be more clinically relevant than it [135]. Similar results were found in studies with papillary thyroid carcinoma and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST); in both cases, telomerase reactivation was also more relevant than ALT to predict clinical outcome [136, 137].

## CONCLUSION

Most of the current anti-cancer drugs target the cell proliferation process. However, this process also occurs in normal healthy cells; thereby, targeting cell immortalization may lead to more specific and efficient drugs. In this scenario, beyond knowing mechanistic details of alternative lengthening of telomeres, a good drug development strategy requires choosing the more appropriate cancer model, in other words, the kind of tumor for which ALT represents the worst prognostic. We summarized data from several studies with clinical samples to highlight the clinical relevance of ALT for some specific tumor types.

The new generation of compounds for anti-telomerase therapy in oncology may provoke an increased incidence of ALT by selecting tumor cells with that phenotype due to intra-tumor heterogeneity [138, 139, 140, 141, 142], what makes the development of anti-ALT cells drugs even more crucial. The effort of many groups studying the theme around the world and the new insights on the ALT mechanism may give us the prototypes for those drugs soon, so that clinical understanding patterns of ALT tumors is mandatory. Unfortunately, till now, there are many potential biases in most of the studies with clinical samples, such as different markers and parameters to classify a tumor as ALT-positive, but its relevance to some specific kind of tumors began to be clear.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## FUNDING

The authors acknowledge the Brazilian public institutions that supported this work. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and the Federal District Research Support Foundation – FAPDF.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

## REFERENCES

- [1] Bernardes de Jesus, B.; Blasco, M.A. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.*, **2013**, *29*(9), 513-520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007> PMID: 23876621
- [2] Kong, F.; Zheng, C.; Xu, D. Telomerase as a “stemness” enzyme. *Sci. China Life Sci.*, **2014**, *57*(6), 564-570. <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-014-4666-6> PMID: 24829107
- [3] Avilion, A.A.; Piatyszek, M.A.; Gupta, J.; Shay, J.W.; Bacchetti, S.; Greider, C.W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.*, **1996**, *56*(3), 645-650. PMID: 8564985
- [4] Feijoo, P.; Dominguez, D.; Tusell, L.; Genesca, A. Telomere-dependent genomic integrity: evolution of the fusion-bridge-breakage cycle concept. *Curr. Pharm. Des.*, **2014**, *20*(41), 6375-6385. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140630085416> PMID: 24975612
- [5] Bär, C.; Blasco, M.A. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *F1000 Res.*, **2016**, *5*, F1000. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7020.1> PMID: 27081482
- [6] Jafri, M.A.; Ansari, S.A.; Alqahtani, M.H.; Shay, J.W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.*, **2016**, *8*(1), 69. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x> PMID: 27323951
- [7] Bryan, T.M.; Englezou, A.; Gupta, J.; Bacchetti, S.; Reddel, R.R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.*, **1995**, *14*(17), 4240-4248. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00098.x> PMID: 7556065

- [8] Bryan, T.M.; Englezou, A.; Dalla-Pozza, L.; Dunham, M.A.; Reddel, R.R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.*, **1997**, *3*(11), 1271-1274. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1197-1271> PMID: 9359704
- [9] Cesare, A.J.; Reddel, R.R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, *11*(5), 319-330. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2763> PMID: 20351727
- [10] Wojtyla, A.; Gladych, M.; Rubis, B. Human telomerase activity regulation. *Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *38*(5), 3339-3349. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0439-x> PMID: 21086176
- [11] Draskovic, I.; Londono-Vallejo, A. Telomere recombination and the ALT pathway: a therapeutic perspective for cancer. *Curr. Pharm. Des.*, **2014**, *20*(41), 6466-6471. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140630085857> PMID: 24975611
- [12] Pompili, L.; Leonetti, C.; Biroccio, A.; Salvati, E. Diagnosis and treatment of ALT tumors: is Trabectedin a new therapeutic option? *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2017**, *36*(1), 189. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-017-0657-3> PMID: 29273061
- [13] Murnane, J.P.; Sabatier, L.; Marder, B.A.; Morgan, W.F. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J.*, **1994**, *13*(20), 4953-4962. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06822.x> PMID: 7957062
- [14] Henderson, S.; Allsopp, R.; Spector, D.; Wang, S.S.; Harley, C. In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation. *J. Cell Biol.*, **1996**, *134*(1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.134.1.1> PMID: 8698806
- [15] Barroso-González, J.; García-Expósito, L.; Hoang, S.M.; Lynskey, M.L.; Roncaioli, J.L.; Ghosh, A.; Wallace, C.T.; Modesti, M.; Bernstein, K.A.; Sarkar, S.N.; Watkins, S.C.; O'Sullivan, R.J. RAD51AP1 Is an Essential Mediator of Alternative Lengthening of Telomeres. *Mol. Cell*, **2019**, *76*, 1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.009>
- [16] Ge, Y.; Wu, S.; Zhang, Z.; Li, X.; Li, F.; Yan, S.; Liu, H.; Huang, J.; Zhao, Y. Inhibition of p53 and/or AKT as a new therapeutic approach specifically targeting ALT cancers. *Protein Cell*, **2019**, *1*-17. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-019-0634-z>
- [17] Gaspar, T.B.; Sá, A.; Lopes, J.M.; Sobrinho-Simões, M.; Soares, P.; Vinagre, J. Telomere maintenance mechanisms in cancer. *Genes (Basel)*, **2018**, *9*(5)E241. <http://dx.doi.org/10.3390/genes9050241> PMID: 29751586
- [18] Folini, M.; Venturini, L.; Cimino-Reale, G.; Zaffaroni, N. Telomeres as targets for anticancer therapies. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2011**, *15*(5), 579-593. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2011.556621> PMID: 21288186
- [19] Karnitz, L.M.; Zou, L. Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2015**, *21*(21), 4780-4785. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0479> PMID: 26362996
- [20] Santambrogio, F.; Gandellini, P.; Cimino-Reale, G.; Zaffaroni, N.; Folini, M. MicroRNA-dependent regulation of telomere maintenance mechanisms: a field as much unexplored as potentially promising. *Curr. Pharm. Des.*, **2014**, *20*(41), 6404-6421. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140630095918> PMID: 24975607
- [21] Pan, X.; Drosopoulos, W.C.; Sethi, L.; Madireddy, A.; Schildkraut, C.L.; Zhang, D. FANCM, BRCA1, and BLM cooperatively resolve the replication stress at the ALT telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*(29), E5940-E5949. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1708065114> PMID: 28673972
- [22] Lu, R.; O'Rourke, J.J.; Sobinoff, A.P.; Allen, J.A.M.; Nelson, C.B.; Tomlinson, C.G.; Lee, M.; Reddel, R.R.; Deans, A.J.; Pickett, H.A. The FANCM-BLM-TOP3A-RMI complex suppresses alternative lengthening of telomeres (ALT). *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 2252. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10180-6> PMID: 31138797
- [23] Silva, B.; Pentz, R.; Figueira, A.M.; Arora, R.; Lee, Y.W.; Hodson, C.; Wischniewski, H.; Deans, A.J.; Azzalin, C.M. FANCM limits ALT activity by restricting telomeric replication stress induced by deregulated BLM and R-loops. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 2253. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10179-z> PMID: 31138795
- [24] Yeager, T.R.; Neumann, A.A.; Englezou, A.; Huschtscha, L.I.; Noble, J.R.; Reddel, R.R. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.*, **1999**, *59*(17), 4175-4179. PMID: 10485449
- [25] Zhao, Y.M.; Li, J.Y.; Lan, J.P.; Lai, X.Y.; Luo, Y.; Sun, J.; Yu, J.; Zhu, Y.Y.; Zeng, F.F.; Zhou, Q.; Huang, H. Cell cycle dependent telomere regulation by telomerase in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *369*(4), 1114-1119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.011> PMID: 18339310
- [26] Henson, J.D.; Reddel, R.R. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett.*, **2010**, *584*(17), 3800-3811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.009> PMID: 20542034
- [27] Fasching, C.L.; Neumann, A.A.; Muntoni, A.; Yeager, T.R.; Reddel, R.R. DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res.*, **2007**, *67*(15), 7072-7077. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1556> PMID: 17652140
- [28] Jiang, W.Q.; Ringertz, N. Altered distribution of the promyelocytic leukemia-associated protein is associated with cellular senescence. *Cell Growth Differ.*, **1997**, *8*(5), 513-522. PMID: 9213441
- [29] Cerone, M.A.; Autexier, C.; Londoño-Vallejo, J.A.; Bacchetti, S. A human cell line that maintains telomeres in the absence of telomerase and of key markers of ALT. *Oncogene*, **2005**, *24*(53), 7893-7901. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208934> PMID: 16116482
- [30] Londoño-Vallejo, J.A.; Der-Sarkissian, H.; Cazes, L.; Bacchetti, S.; Reddel, R.R. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res.*, **2004**, *64*(7), 2324-2327. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-4035> PMID: 15059879
- [31] Aymard, F.; Bugler, B.; Schmidt, C.K.; Guillou, E.; Caron, P.; Briois, S.; Iacovoni, J.S.; Daburon, V.; Miller, K.M.; Jackson, S.P.; Legube, G. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2014**, *21*(4), 366-374. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2796> PMID: 24658350
- [32] Zhdanova, N.S.; Rubtsov, N.B. Telomere recombination in normal mammalian cells. *Genetika*, **2016**, *52*(1), 14-23. PMID: 27183789
- [33] Dunham, M.A.; Neumann, A.A.; Fasching, C.L.; Reddel, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.*, **2000**, *26*(4), 447-450. <http://dx.doi.org/10.1038/82586> PMID: 11101843
- [34] Cesare, A.J.; Griffith, J.D. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol. Cell Biol.*, **2004**, *24*(22), 9948-9957. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.22.9948-9957.2004> PMID: 15509797
- [35] Wang, R.C.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*, **2004**, *119*(3), 355-368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.011> PMID: 15507207
- [36] Henson, J.D.; Cao, Y.; Huschtscha, L.I.; Chang, A.C.; Au, A.Y.; Pickett, H.A.; Reddel, R.R. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat. Biotechnol.*, **2009**, *27*(12), 1181-1185. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1587> PMID: 19935656
- [37] Henson, J.D.; Lau, L.M.; Koch, S.; Martin La Rotta, N.; Dagg, R.A.; Reddel, R.R. The C-Circle Assay for alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Methods*, **2017**, *114*, 74-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.08.016> PMID: 27595911
- [38] Samassekou, O.; Malina, A.; Hébert, J.; Yan, J. Presence of alternative lengthening of telomeres associated circular extrachromosome telomere repeats in primary leukemia cells of chronic myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.*, **2013**, *6*, 26. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-6-26> PMID: 23547895

- [39] Lau, L.M.; Dagg, R.A.; Henson, J.D.; Au, A.Y.; Royds, J.A.; Reddel, R.R. Detection of alternative lengthening of telomeres by telomere quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, *41*(2)e34 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks781> PMID: 22923525
- [40] Tomaska, L.; Nosek, J.; Kar, A.; Willcox, S.; Griffith, J.D. A new view of the t-loop junction: implications for self-primed telomere extension, expansion of disease-related nucleotide repeat blocks, and telomere evolution. *Front. Genet.*, **2019**, *10*, 792. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00792> PMID: 31475042
- [41] Li, F.; Deng, Z.; Zhang, L.; Wu, C.; Jin, Y.; Hwang, I.; Vladimirova, O.; Xu, L.; Yang, L.; Lu, B.; Dheekollu, J.; Li, J.Y.; Feng, H.; Hu, J.; Vakoc, C.R.; Ying, H.; Paik, J.; Lieberman, P.M.; Zheng, H. ATRX loss induces telomere dysfunction and necessitates induction of alternative lengthening of telomeres during human cell immortalization. *EMBO J.*, **2019**, *38*(19)e96659 <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201796659> PMID: 31454099
- [42] Wu, G.; Chen, L.; Liu, W.; Yang, D. Molecular recognition of the hybrid-type G-quadruplexes in human telomeres. *Molecules*, **2019**, *24*(8)E1578 <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24081578> PMID: 31013622
- [43] Lee, M.; Teber, E.T.; Holmes, O.; Nones, K.; Patch, A.M.; Dagg, R.A.; Lau, L.M.S.; Lee, J.H.; Napier, C.E.; Arthur, J.W.; Grimmond, S.M.; Hayward, N.K.; Johansson, P.A.; Mann, G.J.; Scolyer, R.A.; Wilmott, J.S.; Reddel, R.R.; Pearson, J.V.; Waddell, N.; Pickett, H.A. Telomere sequence content can be used to determine ALT activity in tumours. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, *46*(10), 4903-4918. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky297> PMID: 29718321
- [44] Nabetani, A.; Ishikawa, F. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2009**, *29*(3), 703-713. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00603-08> PMID: 19015236
- [45] Xu, B.; Peng, M.; Song, Q. The co-expression of telomerase and ALT pathway in human breast cancer tissues. *Tumour Biol.*, **2014**, *35*(5), 4087-4093. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1534-0> PMID: 24375252
- [46] Chen, Y.J.; Hakin-Smith, V.; Teo, M.; Xinarianos, G.E.; Jellinek, D.A.; Carroll, T.; McDowell, D.; MacFarlane, M.R.; Boet, R.; Baguley, B.C.; Braithwaite, A.W.; Reddel, R.R.; Royds, J.A. Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Res.*, **2006**, *66*(13), 6473-6476. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0910> PMID: 16818615
- [47] Pal, D.; Sharma, U.; Khajuria, R.; Singh, S.K.; Kakkar, N.; Prasad, R. Augmented telomerase activity, reduced telomere length and the presence of alternative lengthening of telomere in renal cell carcinoma: plausible predictive and diagnostic markers. *Gene*, **2015**, *562*(2), 145-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.079> PMID: 25769384
- [48] Hakin-Smith, V.; Jellinek, D.A.; Levy, D.; Carroll, T.; Teo, M.; Timperley, W.R.; McKay, M.J.; Reddel, R.R.; Royds, J.A. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet*, **2003**, *361*(9360), 836-838. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12681-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12681-5) PMID: 12642053
- [49] Dilley, R.L.; Greenberg, R.A. Alternative telomere maintenance and cancer. *Trends Cancer*, **2015**, *1*(2), 145-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2015.07.007> PMID: 26645051
- [50] Pickett, H.A.; Reddel, R.R. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2015**, *22*(11), 875-880. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3106> PMID: 26581522
- [51] Matsuo, T.; Shimose, S.; Kubo, T.; Fujimori, J.; Yasunaga, Y.; Ochi, M. Telomeres and telomerase in sarcomas. *Anticancer Res.*, **2009**, *29*(10), 3833-3836. PMID: 19846916
- [52] Liau, J.Y.; Lee, J.C.; Tsai, J.H.; Yang, C.Y.; Liu, T.L.; Ke, Z.L.; Hsu, H.H.; Jeng, Y.M. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Mod. Pathol.*, **2015**, *28*(12), 1545-1554. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2015.114> PMID: 26428317
- [53] Lawlor, R.T.; Veronese, N.; Pea, A.; Nottegar, A.; Smith, L.; Pilati, C.; Demurtas, J.; Fassan, M.; Cheng, L.; Luchini, C. Alternative lengthening of telomeres (ALT) influences survival in soft tissue sarcomas: a systematic review with meta-analysis. *BMC Cancer*, **2019**, *19*(1), 232. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-019-5424-8> PMID: 30871494
- [54] Zhou, J.; Reddy, M.V.; Wilson, B.K.J.; Blair, D.A.; Taha, A.; Frampton, C.M.; Eiholzer, R.A.; Gan, P.Y.C.; Ziad, F.; Thothathil, Z.; Kirs, S.; Hung, N.A.; Royds, J.A.; Slatter, T.L. MR imaging characteristics associate with tumor-associated macrophages in glioblastoma and provide an improved signature for survival prognostication. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, **2018**, *39*(2), 252-259. <http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A5441> PMID: 29191871
- [55] Durant, S.T. Telomerase-independent paths to immortality in predictable cancer subtypes. *J. Cancer*, **2012**, *3*, 67-82. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.3965> PMID: 22315652
- [56] Ohba, S.; Hirose, Y. Association between mutant IDHs and tumorigenesis in gliomas. *Med. Mol. Morphol.*, **2018**, *51*(4), 194-198. <http://dx.doi.org/10.1007/s00795-018-0189-8> PMID: 29633022
- [57] Nguyen, D.N.; Heaphy, C.M.; de Wilde, R.F.; Orr, B.A.; Odia, Y.; Eberhart, C.G.; Meeker, A.K.; Rodriguez, F.J. Molecular and morphologic correlates of the alternative lengthening of telomeres phenotype in high-grade astrocytomas. *Brain Pathol.*, **2013**, *23*(3), 237-243. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00630.x> PMID: 22928601
- [58] Cai, J.; Yang, P.; Zhang, C.; Zhang, W.; Liu, Y.; Bao, Z.; Liu, X.; Du, W.; Wang, H.; Jiang, T.; Jiang, C. ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples. *Oncotarget*, **2014**, *5*(9), 2551-2561. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.1838> PMID: 24810474
- [59] Kannan, K.; Inagaki, A.; Silber, J.; Gorovets, D.; Zhang, J.; Kasthuber, E.R.; Heguy, A.; Petrini, J.H.; Chan, T.A.; Huse, J.T. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget*, **2012**, *3*(10), 1194-1203. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.689> PMID: 23104868
- [60] Jiao, Y.; Killela, P.J.; Reitman, Z.J.; Rasheed, A.B.; Heaphy, C.M.; de Wilde, R.F.; Rodriguez, F.J.; Rosenberg, S.; Oba-Shinjo, S.M.; Nagahashi Marie, S.K.; Bettegowda, C.; Agrawal, N.; Lipp, E.; Pirozzi, C.; Lopez, G.; He, Y.; Friedman, H.; Friedman, A.H.; Riggins, G.J.; Holdhoff, M.; Burger, P.; McLendon, R.; Bigner, D.D.; Vogelstein, B.; Meeker, A.K.; Kinzler, K.W.; Papadopoulos, N.; Diaz, L.A.; Yan, H. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*, **2012**, *3*(7), 709-722. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.588> PMID: 22869205
- [61] Abedalthagafi, M.; Phillips, J.J.; Kim, G.E.; Mueller, S.; Haas-Kogen, D.A.; Marshall, R.E.; Croul, S.E.; Santi, M.R.; Cheng, J.; Zhou, S.; Sullivan, L.M.; Martinez-Lage, M.; Judkins, A.R.; Perry, A. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Mod. Pathol.*, **2013**, *26*(11), 1425-1432. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.90> PMID: 23765250
- [62] Wiestler, B.; Capper, D.; Holland-Letz, T.; Korshunov, A.; von Deimling, A.; Pfister, S.M.; Platten, M.; Weller, M.; Wick, W. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol.*, **2013**, *126*(3), 443-451. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1156-z> PMID: 23904111
- [63] Mangerel, J.; Price, A.; Castelo-Branco, P.; Brzezinski, J.; Buczkowicz, P.; Rakopoulos, P.; Merino, D.; Baskin, B.; Wasserman, J.; Mistry, M.; Barszczyk, M.; Picard, D.; Mack, S.; Remke, M.; Starkman, H.; Elizabeth, C.; Zhang, C.; Alon, N.; Lees, J.; Andrulelis, I.L.; Wunder, J.S.; Jabado, N.; Johnston, D.L.; Rutka, J.T.; Dirks, P.B.; Bouffet, E.; Taylor, M.D.; Huang, A.; Malkin, D.; Hawkins, C.; Tabori, U. Alternative lengthening of telomeres is enriched in, and impacts survival of TP53 mutant pediatric malignant brain tumors. *Acta Neuropathol.*, **2014**, *128*(6), 853-862. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-014-1348-1> PMID: 25315281
- [64] Minasi, S.; Baldi, C.; Pietsch, T.; Donofrio, V.; Pollo, B.; Antonelli, M.; Massimino, M.; Giangaspero, F.; Buttarelli, F.R. Telomere

- elongation via alternative lengthening of telomeres (ALT) and telomerase activation in primary metastatic medulloblastoma of childhood. *J. Neurooncol.*, **2019**, *142*(3), 435-444.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11060-019-03127-w> PMID: 30830680
- [65] Henson, J.D.; Hannay, J.A.; McCarthy, S.W.; Royds, J.A.; Yeager, T.R.; Robinson, R.A.; Wharton, S.B.; Jellinek, D.A.; Arbuckle, S.M.; Yoo, J.; Robinson, B.G.; Learoyd, D.L.; Stalley, P.D.; Bonar, S.F.; Yu, D.; Pollock, R.E.; Reddel, R.R. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*(1), 217-225.  
 PMID: 15671549
- [66] McDonald, K.L.; McDonnell, J.; Muntoni, A.; Henson, J.D.; Hegi, M.E.; von Deimling, A.; Wheeler, H.R.; Cook, R.J.; Biggs, M.T.; Little, N.S.; Robinson, B.G.; Reddel, R.R.; Royds, J.A. Presence of alternative lengthening of telomeres mechanism in patients with glioblastoma identifies a less aggressive tumor type with longer survival. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2010**, *69*(7), 729-736.  
<http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181e576cf> PMID: 20535033
- [67] La Torre, D.; Aguenouz, M.; Conti, A.; Giusa, M.; Raffa, G.; Abbritti, R.V.; Germano, A.; Angileri, F.F. Potential clinical role of telomere length in human glioblastoma. *Transl. Med. UniSa*, **2011**, *1*, 243-270.  
 PMID: 23905037
- [68] Fogli, A.; Demattei, M.V.; Corset, L.; Vaur-Barrière, C.; Chautard, E.; Biau, J.; Kémény, J.L.; Godfraind, C.; Pereira, B.; Khalil, T.; Grandin, N.; Arnaud, P.; Charbonneau, M.; Verrelle, P. Detection of the alternative lengthening of telomeres pathway in malignant gliomas for improved molecular diagnosis. *J. Neurooncol.*, **2017**, *135*(2), 381-390.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11060-017-2585-7> PMID: 28755323
- [69] Sampl, S.; Pramhas, S.; Stern, C.; Preusser, M.; Marosi, C.; Holzmann, K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl. Oncol.*, **2012**, *5*(1), 56-65.  
<http://dx.doi.org/10.1593/tlo.11202> PMID: 22348177
- [70] Rodriguez, F.J.; Graham, M.K.; Brosnan-Cashman, J.A.; Barber, J.R.; Davis, C.; Vizcaino, M.A.; Palsgrove, D.N.; Giannini, C.; Pekmezci, M.; Dahiya, S.; Gokden, M.; Noë, M.; Wood, L.D.; Pratilas, C.A.; Morris, C.D.; Belzberg, A.; Blakeley, J.; Heaphy, C.M. Telomere alterations in neurofibromatosis type 1-associated solid tumors. *Acta Neuropathol. Commun.*, **2019**, *7*(1), 139.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s40478-019-0792-5> PMID: 31462295
- [71] Cesare, A.J.; Kaul, Z.; Cohen, S.B.; Napier, C.E.; Pickett, H.A.; Neumann, A.A.; Reddel, R.R. Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*(12), 1244-1251.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1725> PMID: 19935685
- [72] Lee, J.; Solomon, D.A.; Tihan, T. The role of histone modifications and telomere alterations in the pathogenesis of diffuse gliomas in adults and children. *J. Neurooncol.*, **2017**, *132*(1), 1-11.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11060-016-2349-9> PMID: 28064387
- [73] Rodriguez, F.J.; Brosnan-Cashman, J.A.; Allen, S.J.; Vizcaino, M.A.; Giannini, C.; Camelo-Piragua, S.; Webb, M.; Matsushita, M.; Wadhvani, N.; Tabbarah, A.; Hamideh, D.; Jiang, L.; Chen, L.; Arvanitis, L.D.; Alnajjar, H.H.; Barber, J.R.; Rodriguez-Velasco, A.; Orr, B.; Heaphy, C.M. Alternative lengthening of telomeres, ATRX loss and H3-K27M mutations in histologically defined pilocytic astrocytoma with anaplasia. *Brain Pathol.*, **2019**, *29*(1), 126-140.  
<http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12646> PMID: 30192422
- [74] Naderlinger, E.; Holzmann, K. Epigenetic Regulation of Telomere Maintenance for Therapeutic Interventions in Gliomas. *Genes (Basel)*, **2017**, *8*(5), 145.  
<http://dx.doi.org/10.3390/genes8050145> PMID: 28513547
- [75] Silvestre, D.C.; Pineda, J.R.; Hoffschir, F.; Studler, J.M.; Mouthon, M.A.; Plumio, F.; Junier, M.P.; Chneiweiss, H.; Boussin, F.D. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells*, **2011**, *29*(3), 440-451.  
<http://dx.doi.org/10.1002/stem.600> PMID: 21425407
- [76] Hung, N.A.; Eiholzer, R.A.; Kirs, S.; Zhou, J.; Ward-Hartstonge, K.; Wiles, A.K.; Frampton, C.M.; Taha, A.; Royds, J.A.; Slatter, T.L. Telomere profiles and tumor-associated macrophages with different immune signatures affect prognosis in glioblastoma. *Mod. Pathol.*, **2016**, *29*(3), 212-226.  
<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2015.156> PMID: 26769142
- [77] Hung, N.; Chen, Y.J.; Taha, A.; Olivecrona, M.; Boet, R.; Wiles, A.; Warr, T.; Shaw, A.; Eiholzer, R.; Baguley, B.C.; Eccles, M.R.; Braithwaite, A.W.; Macfarlane, M.; Royds, J.A.; Slatter, T. Increased paired box transcription factor 8 has a survival function in glioma. *BMC Cancer*, **2014**, *14*(1), 159.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-159> PMID: 24602166
- [78] Lundberg, G.; Sehic, D.; Lämsberg, J.K.; Øra, I.; Frigyesi, A.; Castel, V.; Navarro, S.; Piqueras, M.; Martinsson, T.; Noguera, R.; Gisselsson, D. Alternative lengthening of telomeres--an enhanced chromosomal instability in aggressive non-MYC amplified and telomere elongated neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **2011**, *50*(4), 250-262.  
<http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20850> PMID: 21319260
- [79] Tabori, U.; Dome, J.S. Telomere biology of pediatric cancer. *Cancer Invest.*, **2007**, *25*(3), 197-208.  
<http://dx.doi.org/10.1080/07357900701208683> PMID: 17530490
- [80] Pezzolo, A.; Pistorio, A.; Gambini, C.; Haupt, R.; Ferraro, M.; Erminio, G.; De Bernardi, B.; Garaventa, A.; Pistoia, V. Intratumoral diversity of telomere length in individual neuroblastoma tumors. *Oncotarget*, **2015**, *6*(10), 7493-7503.  
<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2115> PMID: 25595889
- [81] Onitake, Y.; Hiyama, E.; Kamei, N.; Yamaoka, H.; Sueda, T.; Hiyama, K. Telomere biology in neuroblastoma: telomere binding proteins and alternative strengthening of telomeres. *J. Pediatr. Surg.*, **2009**, *44*(12), 2258-2266.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2009.07.046> PMID: 20006006
- [82] Peifer, M.; Hirtwig, F.; Roels, F.; Dreidax, D.; Gartlgruber, M.; Menon, R.; Krämer, A.; Roncaioli, J.L.; Sand, F.; Heuckmann, J.M.; Ikram, F.; Schmidt, R.; Ackermann, S.; Engesser, A.; Kahlert, Y.; Vogel, W.; Altmüller, J.; Nürnberg, P.; Thierry-Mieg, J.; Thierry-Mieg, D.; Mariappan, A.; Heynck, S.; Mariotti, E.; Henrich, K.O.; Gloeckner, C.; Bosco, G.; Leuschner, I.; Schweiger, M.R.; Savelyeva, L.; Watkins, S.C.; Shao, C.; Bell, E.; Höfer, T.; Achter, V.; Lang, U.; Theissen, J.; Volland, R.; Saadati, M.; Eggert, A.; de Wilde, B.; Berthold, F.; Peng, Z.; Zhao, C.; Shi, L.; Ortmann, M.; Büttner, R.; Perner, S.; Hero, B.; Schramm, A.; Schulte, J.H.; Herrmann, C.; O'Sullivan, R.J.; Westermann, F.; Thomas, R.K.; Fischer, M. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*, **2015**, *526*(7575), 700-704.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature14980> PMID: 26466568
- [83] Kurihara, S.; Hiyama, E.; Onitake, Y.; Yamaoka, E.; Hiyama, K. Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.*, **2014**, *49*(12), 1835-1838.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.09.029> PMID: 25487495
- [84] Duan, X.F.; Zhao, Q. TERT-mediated and ATRX-mediated Telomere Maintenance and Neuroblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **2018**, *40*(1), 1-6.  
<http://dx.doi.org/10.1097/MPH.0000000000000840> PMID: 28452859
- [85] de Wilde, R.F.; Heaphy, C.M.; Maitra, A.; Meeker, A.K.; Edil, B.H.; Wolfgang, C.L.; Vriens, M.R. Loss of ATRX or DAXX expression and concomitant acquisition of the alternative lengthening of telomeres phenotype are late events in a small subset of MEN-1 syndrome pancreatic neuroendocrine tumors. *Modern Pathology* *25.7*, **2012**, 1033  
<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2012.53>
- [86] Marinoni, I.; Kurrer, A.S.; Vassella, E.; Dettmer, M.; Rudolph, T.; Banz, V.; Hunger, F.; Pasquinelli, S.; Speel, E.J.; Perren, A. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology*, **2014**, *146*(2), 453-60.e5.  
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.020> PMID: 24148618
- [87] Kim, H.S.; Lee, H.S.; Nam, K.H.; Choi, J.; Kim, W.H. Telomere length abnormalities and telomerase RNA component expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Anticancer Res.*, **2015**, *35*(6), 3501-3510.  
 PMID: 26026117
- [88] Kim, J.Y.; Brosnan-Cashman, J.A.; An, S.; Kim, S.J.; Song, K.B.; Kim, M.S.; Kim, M.J.; Hwang, D.W.; Meeker, A.K.; Yu, E.; Kim,

- S.C.; Hruban, R.H.; Heaphy, C.M.; Hong, S.M. Alternative lengthening of telomeres in primary pancreatic neuroendocrine tumors is associated with aggressive clinical behavior and poor survival. *Clin. Cancer Res.*, **2017**, *23*(6), 1598-1606. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1147> PMID: 27663587
- [89] Singhi, A.D.; Liu, T.C.; Roncaioli, J.L.; Cao, D.; Zeh, H.J.; Zureikat, A.H.; Tsung, A.; Marsh, J.W.; Lee, K.K.; Hogg, M.E.; Bahary, N.; Brand, R.E.; McGrath, K.M.; Slivka, A.; Cressman, K.L.; Fuhrer, K.; O'Sullivan, R.J. Alternative lengthening of telomeres and loss of DAXX/ATRX expression predicts metastatic disease and poor survival in patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2017**, *23*(2), 600-609. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1113> PMID: 27407094
- [90] VandenBussche, C.J.; Allison, D.B.; Graham, M.K.; Charu, V.; Lennon, A.M.; Wolfgang, C.L.; Hruban, R.H.; Heaphy, C.M. Alternative lengthening of telomeres and ATRX/DAXX loss can be reliably detected in FNAs of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Cytopathol.*, **2017**, *125*(7), 544-551. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21857> PMID: 28371511
- [91] Cejas, P.; Drier, Y.; Dreijerink, K.M.A.; Brosens, L.A.A.; Deshpande, V.; Epstein, C.B.; Conemans, E.B.; Morsink, F.H.M.; Graham, M.K.; Valk, G.D.; Vriens, M.R.; Castillo, C.F.; Ferrone, C.R.; Adar, T.; Bowden, M.; Whitton, H.J.; Da Silva, A.; Font-Tello, A.; Long, H.W.; Gaskell, E.; Shores, N.; Heaphy, C.M.; Scinska, E.; Kulke, M.H.; Chung, D.C.; Bernstein, B.E.; Shivdasani, R.A. Enhancer signatures stratify and predict outcomes of non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Nat. Med.*, **2019**, *25*(8), 1260-1265. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0493-4> PMID: 31263286
- [92] Maffiini, A.; Scarpa, A. Genomic landscape of pancreatic neuroendocrine tumours: the international cancer genome consortium. *J. Endocrinol.*, **2018**, *236*(3), R161-R167. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-17-0560> PMID: 29321190
- [93] Dogeas, E.; Karagkounis, G.; Heaphy, C.M.; Hirose, K.; Pawlik, T.M.; Wolfgang, C.L.; Meeker, A.; Hruban, R.H.; Cameron, J.L.; Choti, M.A. Alternative lengthening of telomeres predicts site of origin in neuroendocrine tumor liver metastases. *J. Am. Coll. Surg.*, **2014**, *218*(4), 628-635. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2014.01.001> PMID: 24655849
- [94] Pea, A.; Yu, J.; Marchionni, L.; Noe, M.; Luchini, C.; Pulvirenti, A.; de Wilde, R.F.; Brosens, L.A.; Rezaee, N.; Javed, A.; Gobbo, S.; Regi, P.; Salvia, R.; Bassi, C.; He, J.; Weiss, M.J.; Cameron, J.L.; Offerhaus, G.J.A.; Hruban, R.H.; Lawlor, R.T.; Scarpa, A.; Heaphy, C.M.; Wood, L.D.; Wolfgang, C.L. Genetic analysis of small well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors identifies subgroups with differing risks of liver metastases. *Ann. Surg.*, **2018**, *20*(20), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1097/SLA.0000000000003022> PMID: 30339629
- [95] Zaffaroni, N.; Villa, R.; Pastorino, U.; Cirincione, R.; Incarbone, M.; Alloisio, M.; Curto, M.; Pilotti, S.; Daidone, M.G. Lack of telomerase activity in lung carcinoids is dependent on human telomerase reverse transcriptase transcription and alternative splicing and is associated with long telomeres. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*(8), 2832-2839. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1293> PMID: 15837730
- [96] Cairney, C.J.; Hoare, S.F.; Daidone, M.G.; Zaffaroni, N.; Keith, W.N. High level of telomerase RNA gene expression is associated with chromatin modification, the ALT phenotype and poor prognosis in liposarcoma. *Br. J. Cancer*, **2008**, *98*(8), 1467-1474. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604328> PMID: 18414473
- [97] Lee, J.C.; Jeng, Y.M.; Liau, J.Y.; Tsai, J.H.; Hsu, H.H.; Yang, C.Y. Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas. *Mod. Pathol.*, **2015**, *28*(8), 1064-1073. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2015.67> PMID: 26022452
- [98] Costa, A.; Daidone, M.G.; Daprai, L.; Villa, R.; Cantù, S.; Pilotti, S.; Mariani, L.; Gronchi, A.; Henson, J.D.; Reddel, R.R.; Zaffaroni, N. Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer Res.*, **2006**, *66*(17), 8918-8924. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0273> PMID: 16951210
- [99] Jeyapalan, J.N.; Mendez-Bermudez, A.; Zaffaroni, N.; Dubrova, Y.E.; Royle, N.J. Evidence for alternative lengthening of telomeres in liposarcomas in the absence of ALT-associated PML bodies. *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*(11), 2414-2421. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23412> PMID: 18311780
- [100] Johnson, J.E.; Varkonyi, R.J.; Schwalm, J.; Cragle, R.; Klein-Szanto, A.; Patchefsky, A.; Cukierman, E.; von Mehren, M.; Broccoli, D. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist in liposarcomas. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*(15), 5347-5355. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0684> PMID: 16061847
- [101] Venturini, L.; Motta, R.; Gronchi, A.; Daidone, M.; Zaffaroni, N. Prognostic relevance of ALT-associated markers in liposarcoma: a comparative analysis. *BMC Cancer*, **2010**, *10*, 254. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-254> PMID: 20525266
- [102] Heaphy, C.M.; de Wilde, R.F.; Jiao, Y.; Klein, A.P.; Edil, B.H.; Shi, C.; Bettgowda, C.; Rodriguez, F.J.; Eberhart, C.G.; Hebbard, S.; Offerhaus, G.J.; McLendon, R.; Rasheed, B.A.; He, Y.; Yan, H.; Bigner, D.D.; Oba-Shinjo, S.M.; Marie, S.K.; Riggins, G.J.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Hruban, R.H.; Maitra, A.; Papadopoulos, N.; Meeker, A.K. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*, **2011**, *333*(6041), 425. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1207313> PMID: 21719641
- [103] Heaphy, C.M.; Subhawong, A.P.; Hong, S.M.; Goggins, M.G.; Montgomery, E.A.; Gabrielson, E.; Netto, G.J.; Epstein, J.I.; Lotan, T.L.; Westra, W.H.; Shih, IeM.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; Maitra, A.; Li, Q.K.; Eberhart, C.G.; Taube, J.M.; Rakheja, D.; Kurman, R.J.; Wu, T.C.; Roden, R.B.; Argani, P.; De Marzo, A.M.; Terracciano, L.; Torbenson, M.; Meeker, A.K. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am. J. Pathol.*, **2011**, *179*(4), 1608-1615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.018> PMID: 21888887
- [104] Ulaner, G.A.; Hoffman, A.R.; Otero, J.; Huang, H.Y.; Zhao, Z.; Mazumdar, M.; Gorlick, R.; Meyers, P.; Healey, J.H.; Ladanyi, M. Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **2004**, *41*(2), 155-162. <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20074> PMID: 15287028
- [105] Ulaner, G.A.; Huang, H.Y.; Otero, J.; Zhao, Z.; Ben-Porat, L.; Satagopan, J.M.; Gorlick, R.; Meyers, P.; Healey, J.H.; Huvos, A.G.; Hoffman, A.R.; Ladanyi, M. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(8), 1759-1763. PMID: 12702558
- [106] Sanders, R.P.; Drissi, R.; Billups, C.A.; Daw, N.C.; Valentine, M.B.; Dome, J.S. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*(18), 3790-3797. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.03.043> PMID: 15365076
- [107] Sotillo-Piñero, E.; Sierrasesúmag, L.; Patiño-García, A. Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatr. Res.*, **2004**, *55*(2), 231-235. <http://dx.doi.org/10.1203/01.PDR.0000102455.36737.3C> PMID: 14630995
- [108] Matsuo, T.; Shimose, S.; Kubo, T.; Fujimori, J.; Yasunaga, Y.; Ochi, M. Alternative lengthening of telomeres as a prognostic factor in malignant fibrous histiocytomas of bone. *Anticancer Res.*, **2010**, *30*(12), 4959-4962. PMID: 21187476
- [109] Allegra, A.; Innao, V.; Penna, G.; Gerace, D.; Allegra, A.G.; Musolino, C. Telomerase and telomere biology in hematological diseases: A new therapeutic target. *Leuk. Res.*, **2017**, *56*, 60-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2017.02.002> PMID: 28196338
- [110] Kishitagi, A.; Watts, J. Biological and clinical implications of telomere dysfunction in myeloid malignancies. *Ther. Adv. Hematol.*, **2017**, *8*(11), 317-326. <http://dx.doi.org/10.1177/2040620717731549> PMID: 29093807

- [111] Medves, S.; Auchter, M.; Chambeau, L.; Gazzo, S.; Poncet, D.; Grangier, B.; Verney, A.; Moussay, E.; Ammerlaan, W.; Brisou, G.; Morjani, H.; Géli, V.; Palissot, V.; Berchem, G.; Salles, G.; Wenner, T. A high rate of telomeric sister chromatid exchange occurs in chronic lymphocytic leukaemia B-cells. *Br. J. Haematol.*, **2016**, *174*(1), 57-70.  
http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13995 PMID: 26970083
- [112] M'kacher, R.; Cuceu, C.; Al Jawhari, M.; Morat, L.; Frenzel, M.; Shim, G.; Lenain, A.; Hempel, W.M.; Junker, S.; Girinsky, T.; Colicchio, B.; Dieterlen, A.; Heidingsfelder, L.; Borie, C.; Oudrhiri, N.; Bennaceur-Griscelli, A.; Moralès, O.; Renaud, S.; Van de Wyngaert, Z.; Jeandidier, E.; Delhem, N.; Carde, P. The transition between telomerase and alt mechanisms in hodgkin lymphoma and its predictive value in clinical Outcomes. *Cancers (Basel)*, **2018**, *10*(6), 169.  
http://dx.doi.org/10.3390/cancers10060169 PMID: 29848986
- [113] Slatter, T.L.; Hsia, H.; Samaranyaka, A.; Sykes, P.; Clow, W.B.; Devenish, C.J.; Sutton, T.; Royds, J.A.; Ip, P.P.; Cheung, A.N.; Hung, N.A. Loss of ATRX and DAXX expression identifies poor prognosis for smooth muscle tumours of uncertain malignant potential and early stage uterine leiomyosarcoma. *J. Pathol. Clin. Res.*, **2015**, *1*(2), 95-105.  
http://dx.doi.org/10.1002/cjp2.11 PMID: 27499896
- [114] Liao, J.Y.; Tsai, J.H.; Jeng, Y.M.; Lee, J.C.; Hsu, H.H.; Yang, C.Y. Leiomyosarcoma with alternative lengthening of telomeres is associated with aggressive histologic features, loss of ATRX expression, and poor clinical outcome. *Am. J. Surg. Pathol.*, **2015**, *39*(2), 236-244.  
http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0000000000000324 PMID: 25229770
- [115] Mäkinen, N.; Aavikko, M.; Heikkinen, T.; Taipale, M.; Taipale, J.; Koivisto-Korander, R.; Bützow, R.; Vahteristo, P. Exome sequencing of uterine leiomyosarcomas identifies frequent mutations in TP53, ATRX, and MED12. *PLoS Genet.*, **2016**, *12*(2), e1005850.  
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005850 PMID: 26891131
- [116] Chudasama, P.; Mughal, S.S.; Sanders, M.A.; Hübschmann, D.; Chung, I.; Deeg, K.I.; Wong, S.H.; Rabe, S.; Hlevnjak, M.; Zapatka, M.; Ernst, A.; Kleinheinz, K.; Schlesner, M.; Sieverling, L.; Klink, B.; Schröck, E.; Hoogenboezem, R.M.; Kasper, B.; Heilig, C.E.; Egerer, G.; Wolf, S.; von Kalle, C.; Eils, R.; Stenzinger, A.; Weichert, W.; Glimm, H.; Gröschel, S.; Kopp, H.G.; Omlor, G.; Lehner, B.; Bauer, S.; Schimmack, S.; Ulrich, A.; Mechttersheimer, G.; Rippe, K.; Brors, B.; Hutter, B.; Renner, M.; Hohenberger, P.; Scholl, C.; Fröhling, S. Integrative genomic and transcriptomic analysis of leiomyosarcoma. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*(1), 144.  
http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02602-0 PMID: 29321523
- [117] Lee, Y.K.; Park, N.H.; Lee, H. Prognostic value of alternative lengthening of telomeres-associated biomarkers in uterine sarcoma and uterine carcinosarcoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **2012**, *22*(3), 434-441.  
http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e31823ca017 PMID: 22266933
- [118] Ahvenainen, T.V.; Mäkinen, N.M.; von Nandelstadh, P.; Vahteristo, M.E.A.; Pasanen, A.M.; Bützow, R.C.; Vahteristo, P.M. Loss of ATRX/DAXX expression and alternative lengthening of telomeres in uterine leiomyomas. *Cancer*, **2018**, *124*(24), 4650-4656.  
http://dx.doi.org/10.1002/cncr.31754 PMID: 30423196
- [119] Müller, M.; Heicappell, R.; Krause, H.; Sachsinger, J.; Porsche, C.; Miller, K. Telomerase activity in malignant and benign renal tumors. *Eur. Urol.*, **1999**, *35*(3), 249-255.  
http://dx.doi.org/10.1159/000019856 PMID: 10072629
- [120] Venturini, L.; Daidone, M.G.; Motta, R.; Collini, P.; Spreafico, F.; Terenziani, M.; Piva, L.; Radice, P.; Perotti, D.; Zaffaroni, N. Telomere maintenance in Wilms tumors: first evidence for the presence of alternative lengthening of telomeres mechanism. *Genes Chromosomes Cancer*, **2011**, *50*(10), 823-829.  
http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20903 PMID: 21769957
- [121] Subhawong, A.P.; Heaphy, C.M.; Argani, P.; Konishi, Y.; Kouprina, N.; Nassar, H.; Vang, R.; Meeker, A.K. The alternative lengthening of telomeres phenotype in breast carcinoma is associated with HER-2 overexpression. *Mod. Pathol.*, **2009**, *22*(11), 1423-1431.  
http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2009.125 PMID: 19734843
- [122] Boardman, L.A.; Johnson, R.A.; Viker, K.B.; Hafner, K.A.; Jenkins, R.B.; Riegert-Johnson, D.L.; Smyrk, T.C.; Litzelman, K.; Seo, S.; Gangnon, R.E.; Engelman, C.D.; Rider, D.N.; Vanderboom, R.J.; Thibodeau, S.N.; Petersen, G.M.; Skinner, H.G. Correlation of chromosomal instability, telomere length and telomere maintenance in microsatellite stable rectal cancer: a molecular subclass of rectal cancer. *PLoS One*, **2013**, *8*(11), e80015.  
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080015 PMID: 24278232
- [123] Drulliner, B.R.; Ruan, X.; Johnson, R.; Grill, D.; O'Brien, D.; Lai, T.P.; Rashtak, S.; Felmlee-Devine, D.; Washechek-Aletto, J.; Malykh, A.; Smyrk, T.; Oberg, A.; Liu, H.; Shay, J.W.; Ahlquist, D.A.; Boardman, L.A. Time lapse to colorectal cancer: telomere dynamics define the malignant potential of polyps. *Clin. Transl. Gastroenterol.*, **2017**, *8*(4), e88.  
http://dx.doi.org/10.1038/ctg.2017.16 PMID: 28406492
- [124] Else, T.; Giordano, T.J.; Hammer, G.D. Evaluation of telomere length maintenance mechanisms in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2008**, *93*(4), 1442-1449.  
http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1840 PMID: 18198226
- [125] Basu, N.; Skinner, H.G.; Litzelman, K.; Vanderboom, R.; Baichoo, E.; Boardman, L.A. Telomeres and telomere dynamics: relevance to cancers of the GI tract. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **2013**, *7*(8), 733-748.  
http://dx.doi.org/10.1586/17474124.2013.848790 PMID: 24161135
- [126] Heeg, S. Variations in telomere maintenance and the role of telomerase inhibition in gastrointestinal cancer. *Pharm. Genomics Pers. Med.*, **2015**, *8*, 171-180.  
http://dx.doi.org/10.2147/PGPM.S52808 PMID: 26675332
- [127] Omori, Y.; Nakayama, F.; Li, D.; Kanemitsu, K.; Semba, S.; Ito, A.; Yokozaki, H. Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma. *Cancer Sci.*, **2009**, *100*(3), 413-418.  
http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01063.x PMID: 19154407
- [128] Ohali, A.; Avigad, S.; Naumov, I.; Goshen, Y.; Ash, S.; Yaniv, I. Different telomere maintenance mechanisms in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **2008**, *47*(11), 965-970.  
http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20600 PMID: 18663749
- [129] Job, S.; Draskovic, I.; Burnichon, N.; Buffet, A.; Cros, J.; Lépine, C.; Venisse, A.; Robidel, E.; Verkarre, V.; Meatchi, T.; Sibony, M.; Amar, L.; Bertherat, J.; de Reyniès, A.; Londoño-Vallejo, A.; Favier, J.; Castro-Vega, L.J.; Gimenez-Roqueplo, A.P. Telomerase activation and ATRX mutations are independent risk factors for metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin. Cancer Res.*, **2019**, *25*(2), 760-770.  
http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0139 PMID: 30301828
- [130] Liao, J.Y.; Tsai, J.H.; Yang, C.Y.; Lee, J.C.; Liang, C.W.; Hsu, H.H.; Jeng, Y.M. Alternative lengthening of telomeres phenotype in malignant vascular tumors is highly associated with loss of ATRX expression and is frequently observed in hepatic angiosarcomas. *Hum. Pathol.*, **2015**, *46*(9), 1360-1366.  
http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.05.019 PMID: 26190196
- [131] Panse, G.; Chrisinger, J.S.; Leung, C.H.; Ingram, D.R.; Khan, S.; Wani, K.; Lin, H.; Lazar, A.J.; Wang, W.L. Clinicopathological analysis of ATRX, DAXX and NOTCH receptor expression in angiosarcomas. *Histopathology*, **2018**, *72*(2), 239-247.  
http://dx.doi.org/10.1111/his.13337 PMID: 28796347
- [132] Villa, R.; Daidone, M.G.; Motta, R.; Venturini, L.; De Marco, C.; Vannelli, A.; Kusamura, S.; Baratti, D.; Deraco, M.; Costa, A.; Reddel, R.R.; Zaffaroni, N. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist and differentially affect clinical outcome in diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*(13), 4134-4140.  
http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0099 PMID: 18593991
- [133] Au, A.Y.; Hackl, T.; Yeager, T.R.; Cohen, S.B.; Pass, H.I.; Harris, C.C.; Reddel, R.R. Telomerase activity in pleural malignant mesotheliomas. *Lung Cancer*, **2011**, *73*(3), 283-288.



- <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.12.023> PMID: 21277646
- [134] Wood, L.D.; Heaphy, C.M.; Daniel, H.D.; Naini, B.V.; Lassman, C.R.; Arroyo, M.R.; Kamel, I.R.; Cosgrove, D.P.; Boitnott, J.K.; Meeker, A.K.; Torbenson, M.S. Chromophobe hepatocellular carcinoma with abrupt anaplasia: a proposal for a new subtype of hepatocellular carcinoma with unique morphological and molecular features. *Mod. Pathol.*, **2013**, *26*(12), 1586-1593. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.68> PMID: 23640129
- [135] Wang, N.; Xu, D.; Sofiadis, A.; Höög, A.; Vukojević, V.; Bäckdahl, M.; Zedenius, J.; Larsson, C. Telomerase-dependent and independent telomere maintenance and its clinical implications in medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2014**, *99*(8), E1571-E1579. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2014-1158> PMID: 24758186
- [136] Nasirden, A.; Saito, T.; Fukumura, Y.; Hara, K.; Akaike, K.; Kurisaki-Arakawa, A.; Asahina, M.; Yamashita, A.; Tomomasa, R.; Hayashi, T.; Arakawa, A.; Yao, T. In Japanese patients with papillary thyroid carcinoma, TERT promoter mutation is associated with poor prognosis, in contrast to BRAF<sup>V600E</sup> mutation. *Virchows Arch.*, **2016**, *469*(6), 687-696. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-2027-5> PMID: 27718012
- [137] Venturini, L.; Daidone, M.G.; Motta, R.; Cimino-Reale, G.; Hoare, S.F.; Gronchi, A.; Folini, M.; Keith, W.N.; Zaffaroni, N. Telomere maintenance mechanisms in malignant peripheral nerve sheath tumors: expression and prognostic relevance. *Neuro-oncol.*, **2012**, *14*(6), 736-744. <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nos083> PMID: 22516689
- [138] Queisser, A.; Heeg, S.; Thaler, M.; von Werder, A.; Opitz, O.G. Inhibition of telomerase induces alternative lengthening of telomeres during human esophageal carcinogenesis. *Cancer Genet.*, **2013**, *206*(11), 374-386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.10.001> PMID: 24331919
- [139] Morais, K.D.S.; Arcanjo, D.D.S.; de Faria Lopes, G.P.; da Silva, G.G.; da Mota, T.H.A.; Gabriel, T.R.; Rabello Ramos, D.D.A.; Silva, F.P.; de Oliveira, D.M. Long-term *in vitro* treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells. *Cell Biochem. Funct.*, **2019**, *37*(4), 273-280. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3398> PMID: 31012504
- [140] Morais, K.S.; Guimaraesb, A.F.R.; Ramos, D.A.R.; Silva, F.P.; de Oliveira, D.M. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, **2017**, *28*(7), 750-756. <http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0000000000000508> PMID: 28520570
- [141] Hu, J.; Hwang, S.S.; Liesa, M.; Gan, B.; Sahin, E.; Jaskelioff, M.; Ding, Z.; Ying, H.; Boutin, A.T.; Zhang, H.; Johnson, S.; Ivanova, E.; Kost-Alimova, M.; Protopopov, A.; Wang, Y.A.; Shirihai, O.S.; Chin, L.; DePinho, R.A. Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell*, **2012**, *148*(4), 651-663. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.028> PMID: 22341440
- [142] Gocha, A.R.; Nuovo, G.; Iwenofu, O.H.; Groden, J. Human sarcomas are mosaic for telomerase-dependent and telomerase-independent telomere maintenance mechanisms: implications for telomere-based therapies. *Am. J. Pathol.*, **2013**, *182*(1), 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.001> PMID: 23260199
- [143] Rodriguez, F.J.; Vizcaino, M.A.; Blakeley, J.; Heaphy, C.M. Frequent alternative lengthening of telomeres and ATRX loss in adult NF1-associated diffuse and high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol.*, **2016**, *132*(5), 761-763. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1619-0> PMID: 27650176
- [144] Dorris, K.; Sobo, M.; Onar-Thomas, A.; Panditharatna, E.; Stevenson, C.B.; Gardner, S.L.; Dewire, M.D.; Pierson, C.R.; Olsheski, R.; Rempel, S.A.; Goldman, S.; Miles, L.; Fouladi, M.; Drissi, R. Prognostic significance of telomere maintenance mechanisms in pediatric high-grade gliomas. *J. Neurooncol.*, **2014**, *117*(1), 67-76. <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-014-1374-9> PMID: 24477622

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

## **ANEXO III**



# Long-term in vitro treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells

Karollyne da Silva Morais<sup>1,2</sup> | Daniel da Silva Arcanjo<sup>1</sup> | Giselle Pinto de Faria Lopes<sup>3</sup> |

Guilherme Guimarães da Silva<sup>1</sup> | Tales Henrique Andrade da Mota<sup>1,2</sup> |

Thiago Rodrigues Gabriel<sup>1</sup> | Doralina do Amaral Rabello Ramos<sup>2</sup> | Fábio Pittella Silva<sup>2</sup> |

Diêgo Madureira de Oliveira<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Multidisciplinary Laboratory of Human Health, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Biotechnology Department, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Arraial do Cabo, RJ, Brazil e Research coordination, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

## Correspondence

Diêgo M de Oliveira, Department of Biological Basis of Health Sciences, University of Brasília, Ceilandia Campus, Brasília 72220-900, Brazil. Email: dmadureira@unb.br; diego.madureira@pq.cnpq.br

## Funding information

Federal District Research Support Foundation (FAPDF), Grant/Award Number: 0193.001063/2015; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

Telomerase is a good target for new anticancer drug development because it is present in over 85% of human tumours. However, despite chronic therapy is a condition for anti-telomerase approach, the effects of long-term treatment with telomerase inhibitors remain not well understood. In this work, it was evaluated the effects of long-term treatment of human MDA-MB-231 breast cancer cells with the telomerase inhibitor MST-312. Cells were treated for 72 hours or 140 days, and it was accessed their viability, proliferation rate, morphology, telomeric DNA content, and resistance mechanism. The drug had a clear short-term effect, including chemosensitizing cells for docetaxel and irinotecan, but the chronic exposition led to selection of long telomeres clones, changing characteristics of original cell line. This effect was confirmed in a clonal culture with homogenous karyotype. MRP-1 expression and alternative lengthening of telomeres (ALT) were discarded as additional mechanisms of resistance. This data suggest that, considering the intra-tumour heterogeneity (ITH), what is already a big challenge for treatment of cancer, chronic exposition to telomerase inhibitors can promote tumour adaptations with potential clinical repercussion, drawing attention to ongoing clinical trials and pointing important considerations most times neglected on studies about use of these inhibitors on cancer therapy.

**Significance of the study:** Antitumour action of telomerase inhibitors is well known, but it depends on a long-term exposition because cells will undergo telomere erosion only after many duplication cycles. Recently, the frustrating results of clinical trials with these inhibitors aroused the interest of the scientific community to understand the mechanisms of resistance to anti-telomerase therapy. In this study, we conducted an 18-week experiment to show that telomerase inhibition can lead to cell adaptations and selection of long-telomeres clones, leading to acquisition of resistance. However, we also showed that this inhibitor can sensitize cells to the chemotherapeutic drugs docetaxel and irinotecan.

## KEYWORDS

breast cancer, MST-312, telomerase, telomeres

## 1 | INTRODUCTION

Because cell proliferation is a central process in carcinogenesis, most of the classical antitumour therapeutic approaches include antiproliferative agents. However, strong side effects and resistance are commonly reported as responsible for failure of cancer treatment.<sup>1,2</sup> Another crucial process in the pathogenesis of cancer is the cell immortalization (acquisition of ability to undergo to unlimited replication cycles), what occurs by expression of telomerase in over 85% of human tumours.<sup>3</sup> Then, telomerase inhibition has become a new potential therapeutic approach.<sup>4,5</sup>

Telomerase is an enzyme composed of two main core subunits—hTR (RNA template subunit) and hTERT (catalytic subunit) responsible for telomere length maintenance by compensating its shortening caused by DNA replication during each cell cycle.<sup>6</sup> Whereas this enzyme is generally absent in normal cells and plays a crucial role in tumour ones, it is a good target for new drugs development.<sup>7,8</sup> Telomerase activity is also associated with resistance to specific drugs, as Imatinib.<sup>9</sup>

The anti-tumour potential of many telomerase inhibitors has been investigated,<sup>10-14</sup> but the effects of long-term treatment with these drugs on tumour cells remain not well understood. The telomeric effects of telomerase inhibition require a chronic exposition, then, it is important to access this scope of anti-telomerase strategy. MST-312 is a compound with notable telomerase inhibitory activity in tumour cells, and it has been proposed as a prototype of new anticancer drug.<sup>15-17</sup> This study evaluated the effects of long-term treatment of human MDA-MB-231 (NCI-DTP Cat# MDA-MB-231, RRID: CVCL\_0062) breast cancer cells with MST-312.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Ethical statement

All experiments were conducted in accordance with rigorous ethical standards, and the study conforms to the Wiley's Best Practice Guidelines on Publishing Ethics.

### 2.2 | Cell culture and treatments

Cells were cultured at 37°C with DMEM, supplemented with 44 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. For preliminary cytotoxicity assays, cells were plated in 96-well plates at  $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, incubated for 24 hours and treated for 72 hours with increasing concentrations of MST-312 with the vehicle (0.1% DMSO). A subtoxic concentration was chosen for the long-term treatment, and the cultures were grown in 100-mm (diameter) plates in the continuous presence of the drug or 0.01% DMSO for 140 days or until completely stopping growth. In order to evaluate the action of MST-312 as a chemosensitizer agent, cells were plated in 96-well plates at  $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and, after 24 hours, they were

treated with increasing concentrations of docetaxel and irinotecan (in water) plus MST-312 at 2 µM of 0.5% DMSO for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay.

### 2.3 | Cell viability analysis

Cell viability was measured in 96-well plates by the MTT method. After 2-hour incubation with MTT (1 mg/mL), cells were lysed (20% SDS and 50% dimethylformamide) and absorbance measured at 540 nm. Cell viability was expressed as percentage of the control samples. Trypan blue dye exclusion assay was used to monitor cultures during long-term experiments. Cells were detached from plates using 0.05% trypsin, washed with 20% EDTA in PBS, and centrifuged at 168 g for 6 minutes. The pellet was suspended, trypan blue was added (0.05%), and cells were counted using a haemocytometer. Blue stained cells were considered unviable. A total of 5000 viable cells were seeded in a new 100-mm (diameter) plate to continue the long-term treatment.

### 2.4 | Determination of doubling time (DT)

Cell proliferation profile was accessed by estimating DT (time, in hours, to duplicate amount of cells in culture). Cells were cultured in 96-well plates at subconfluence conditions (1000 cells/well) and maintained at standard conditions for 1 week. The medium was changed each 3 days and cell viability analysed by MTT assay in eight wells at several points of timeline. After, data were plotted in a graph and fitted to a nonlinear regression with exponential equation in order to estimate DT and calculate confidence interval.

### 2.5 | Analysis of MRP1 expression by flow cytometry

The cells ( $0.2 \times 10^6$ ) were incubated for 30 minutes at room temperature with 1 mL of a 1:10 dilution of Becton Dickinson's FACS lysing solution in distilled water. The cells were centrifuged for 3 minutes at 490 g, and the supernatant fluid discarded, and then washed with 0.5% Tween 20 in phosphate buffer saline (PBS). Fixed cells were incubated with 2% bovine serum bovine (BSA)/PBS for 30 minutes, and after a new centrifugation, 10 µL of anti-MRP1 mAb conjugated to fluorescein (FITC) (DAKO, Carpinteria, CA) was added to cells for 30 minutes at room temperature. After one wash with 0.5% Tween 20/PBS, the cells were suspended in 300 µL of 1% formaldehyde/PBS. Cells (10 000) were analysed by Cyan flow cytometry and Summit Software (Beckman coulter). For each test, cells without mAb were used as negative control at 530/40 nm (FL1).

### 2.6 | Functional MDR phenotype evaluation

Cells were suspended in DMEM/10% FBS to a final concentration of  $2 \times 10^5$  per condition. In one condition, the cells were incubated with the fluochrome Rhodamine-123 (200 ng/mL) and another with Rho-

123 and Cyclosporin A (CSA) (200 ng/mL) for 45 minutes at 37°C. Then, cells were washed in ice cold PBS and incubated again for 45 minutes at 37°C with DMEM/10% SFB or CSA. Blockage of functional MRP1 efflux pump by CSA was measured by increased fluorescence. Autofluorescence was used as thresholds. Cells were analysed through the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) gated set around the viable cell population. Analysis of Rho-123 fluorescence was performed at 575/25 nm on Cyan Flow Cytometry with Summit 4.0 software (Beckman Coulter). The Rho-123 efflux was estimated as the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) in cell suspensions with Rho-123 and CSA and the MFI in cell suspensions containing only Rho-123. An increase of the efflux above 1.1 would be considered indicative of MRP1 activity, indicating a positive multidrug resistance (MDR) functional phenotype.

## 2.7 | Detection of C-circles and relative telomeric DNA content

The presence of C-circles (partially double-stranded circles of telomeric C-strand DNA), an alternative lengthening of telomeres (ALT) marker, and relative telomeric DNA content were evaluated as

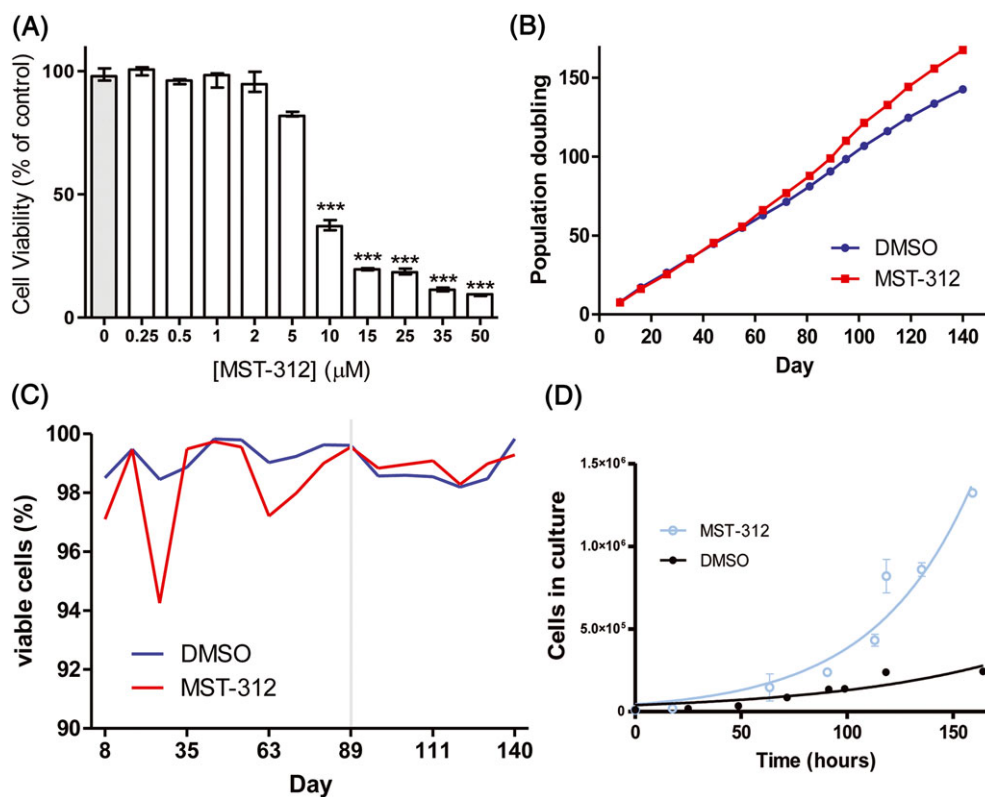
previously described,<sup>15</sup> detection of telomere sequences by qPCR followed by CC assay (with  $\phi$ 29 DNA polymerase). Telomerase positive HeLa cell line and ALT+ U2OS cells were used as negative and positive controls, respectively.

## 2.8 | Cytogenetic analysis

To obtain chromosome preparations, 60% to 70% confluent cultures were incubated with 0.2  $\mu$ g/mL colchicine for 1 hour and detached. They were then incubated with hypotonic buffer (0.075 M KCl) for 15 minutes, fixed with methanol/acetic acid (3:1, v/v) and dropped on glass slides. Giemsa-stained nonmitotic nuclei and metaphase spreads were visualized under an optical microscope.

## 2.9 | Clonal cell line production

For clonal subline production, MDA-MB-231 cells were plated in 96 wells plates at 50 cells/mL (200  $\mu$ L/well). Wells with only one cell were selected for growing clonal cultures. The single cell wells were confirmed by three independent investigators under phase contrast observation 2, 5, 12, and 24 h after plating and followed until



**FIGURE 1** Effects of short-term and long-term treatments on cell viability. A, Analysis of cell viability performed by MTT assay after 72-h treatment with MST-312 at increasing concentrations in MDA-MB-231 cells. Data are expressed as median with ranges and relative to negative control (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test). The  $IC_{50\%}$  value of 8.24  $\mu$ M was estimated by nonlinear regression. B, The long-term treatment with 2- $\mu$ M MST-312 showed discreet change in growth of MDA-MB-231 cultures. Cells treated with the drug showed a higher proliferative profile after 89 days of treatment when compared with control. C, The amount of cells stained with trypan blue showed instability in the treated group also before day 89. D, The difference between proliferation rate of both control and treated group of MDA-MB-231 cells was confirmed by DT calculation—32.07 h (27.27–38.93, 95% confidence interval) for treated cells, 58.34 h (46.19–79.17) for control cells, 44.98 h (35.84–60.37)

confluence is obtained. The clonal culture with most similar proliferative rate to the original cell line was chosen for tests.

## 2.10 | Statistical analysis

Data were tested for normal distribution and expressed as the mean  $\pm$  SEM or median and ranges. Nonparametric tests were used for data with non-normal distribution (figures legends). Experiments were performed at least in triplicate.  $IC_{50\%}$  (inhibitory concentration) and DT were calculated by nonlinear regression of the data.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Treatment with MST-312 impacted on cell viability

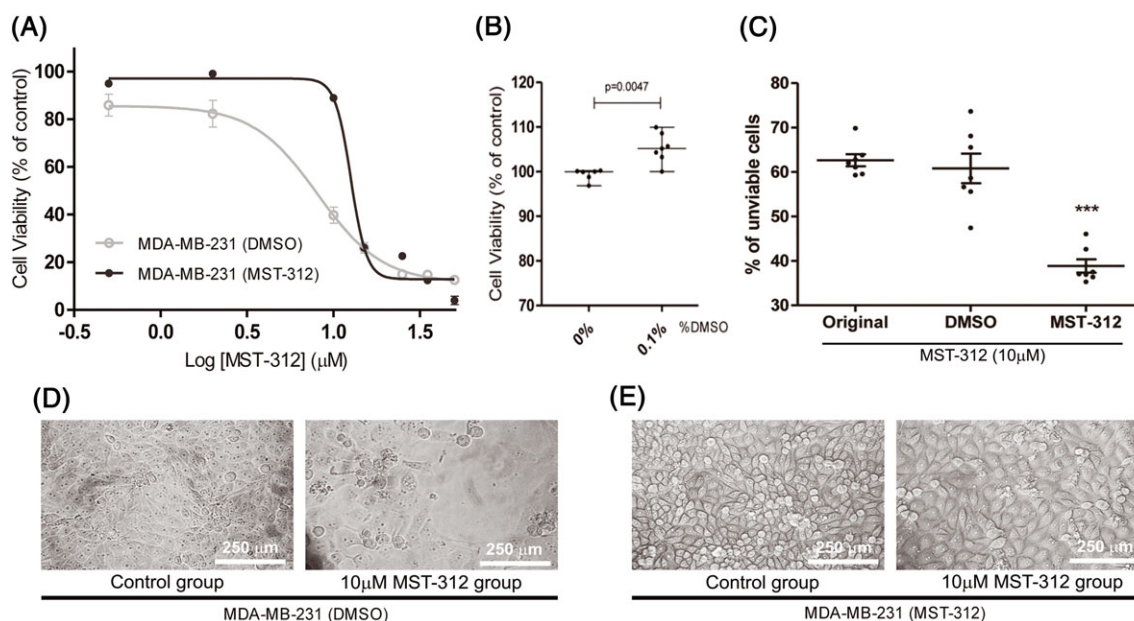
The treatment with MST-312 for 72 hours led to significant decrease in MDA-MB-231 cell viability in a dose-dependent way (Figure 1A). The  $IC_{50\%}$  value was 8.24  $\mu$ M. The subtoxic concentration of 2  $\mu$ M was used for long-term treatment and showed no significant effect on cell proliferation until day 89, but at the end of the experiment the treated cells showed a greater proliferative profile (Figure 1B). The mild and inconstant cytotoxic effect of the drug that could be seen at firsts days was also absent after day 89 (Figure 1C). Calculation of DT confirmed the higher proliferative profile of treated cells after 140 days of exposition (Figure 1D).

### 3.2 | Long-term exposition to MST-312 led to acquisition of resistance

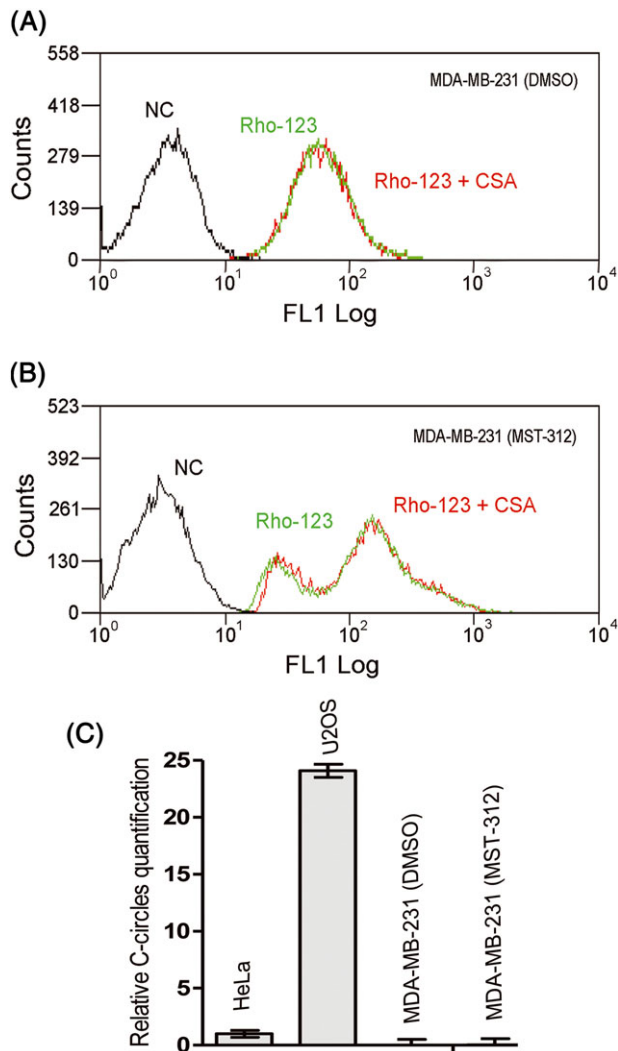
Long-term exposition to MST-312 promoted a slight increase in the 72-hour  $IC_{50\%}$  value but changed significantly the pattern of the dose-response curve (Figure 2A). Cells pre-exposed to MST-312 (MDA-MB-231(MST-312)) also showed a singular response to 0.1% DMSO (Figure 2B). The acquisition of resistance is evident at 10  $\mu$ M (Figure 2C-E), but the long-term treatment did not significantly increase MRP1 expression neither acquired functional MDR phenotype, as the ratio intensity fluorescence (RIF) was less than 1.1 in both culture conditions (Figure 3A,B). However, the activity profile showed that the treatment with MST-312 originated a subpopulation of cells, which is suggestive of selective pressure (Figure 3B). Because classical MDR mechanism was apparently not responsible for the resistance, the presence of ALT marker c-circle was investigated. The treatment with MST-312 was not able to induce c-circle production or selection of ALT clones (Figure 3C).

### 3.3 | The long-term approach promoted chromosomes destabilization and selected cells with longer telomeres

It is expected that inhibition of telomerase activity for a long time leads to chromosome instability and telomeric crisis (breakage-fusion-bridge cycles). In fact, the frequency of crisis associated metaphase



**FIGURE 2** Effects of long-term exposition to MST-312 on cells susceptibility to toxic effect. A, Analysis of cell viability performed by MTT assay after treatment (72 h) with MST-312 at increasing concentrations in MDA-MB-231 cells after long-term treatment with 2- $\mu$ M MST-312 or 0.01% DMSO. The  $IC_{50\%}$  values are 7.8  $\mu$ M for MDA-MB-231(DMSO) and 11.24  $\mu$ M for MDA-MB-231(MST-312). B, The response profile of cells exposed to 0.1% DMSO after long-term treatment with 2- $\mu$ M MST-312 (*Mann-Whitney test*). C, Toxic effect of 10- $\mu$ M MST-312 on original MDA-MB-231 cell line and DMSO or MST-312 pre-exposed cells. Data are percentage of control (measured by MTT assay, \*\*\*  $P < .001$ ; one-way ANOVA followed by *Dunnnett's test*). D, The pictures show the aspect of MDA-MB-231(DMSO) cells in control conditions (left) and after 72 treatment with 10- $\mu$ M MST-312 (right). E, The same for MDA-MB-231(MST-312)



**FIGURE 3** Evaluation of possible mechanisms of resistance to MST-312 telomerase inhibitor. The difference in MRP1 expression between two long-term treated groups (MDA-MB-231(DMSO) and MDA-MB-231(MST-312)) was not significant. The functional MDR phenotype was absent in both groups (A, B). C, Detection of C-circles (alternative lengthening of telomeres—ALT marker). Treatment did not promote acquisition of an ALT phenotype in MDA-MB-231 cells

spreads increased after treatment (Figure 4A,B). The relative telomeric DNA content, which reflects telomere median length, was significantly higher after long-term exposition to MST-312, but also in control group, despite in a mild way (Figure 4C). Whereas MDA-MB-231 cells have very heterogeneous chromosomes, apparently the cells with longest telomeres in this culture were selected by simple continuous maintenance.

### 3.4 | Treatment with MST-312 efficiently stopped proliferation on clonal cultures

In order to prove the hypothesis that the treatment was selecting cells with long telomeres, we developed a clonal culture with homogeneous karyotype (Figure 5A). These clonal MDA-MB-231 cells have

morphology and proliferation rate very similar to original cell line. Also, they are sensible to toxic effects of MST-312 (Figure 5B,C). Interestingly, in this clonal cell, the effect of MST-312 on proliferation became apparent after only 1 week (Figure 5D,E).

### 3.5 | MST-312 enhances cytotoxic effects of chemotherapy drugs

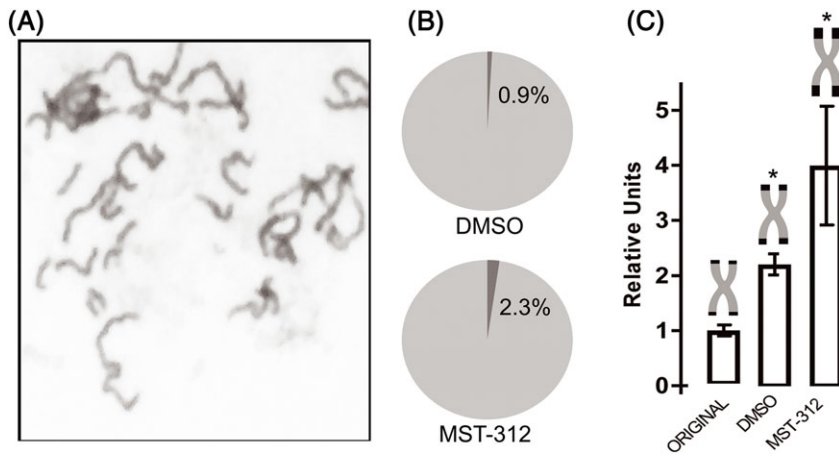
Despite the focus on long-term exposition to MST-312, it was tested if this compound could improve the action of classical drugs docetaxel and irinotecan. In fact, the association with the telomerase inhibitor at subtoxic concentration leads to increasing on cytotoxic effects of both drugs, notably at concentrations greater than 31  $\mu$ M (Figure 6A,B). Cells become totally sensible to irinotecan at concentrations greater than 250  $\mu$ M when associated with MST-312 (Figure 6B). The chemosensitizer effect was strong enough to significantly change the values of IC<sub>50%</sub>.

## 4 | DISCUSSION

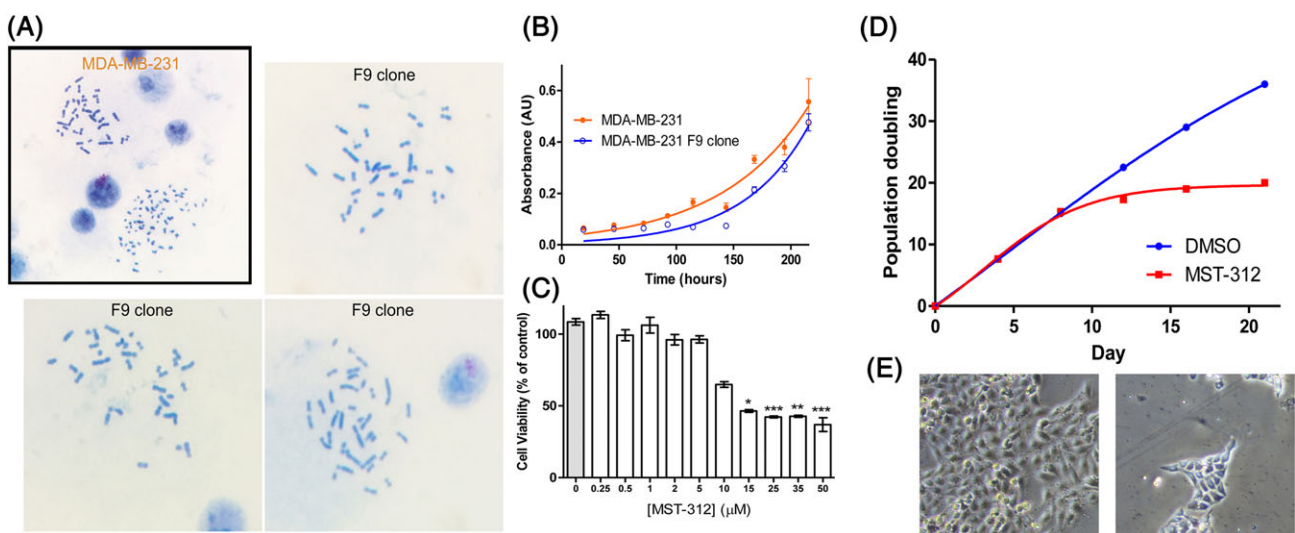
There are many preclinical and clinical studies about anti-telomerase therapy in cancer,<sup>6,18–20</sup> some of them showing short-term activity of MST-312.<sup>21,22</sup> Because the effects of telomerase inhibition on telomere length need a long time to be apparent, the activity of 72-hour treatment suggests an alternative mechanism of action. In fact, MST-312-mediated telomerase inhibition can lead to G2/M cell cycle arrest and apoptosis, even after only 36-hour exposition, and suppress NF- $\kappa$ B pathway.<sup>23</sup>

On the other hand, telomere erosion and senescence are frequently described after long-term treatment of cell cultures with MST-312, despite none of these cells were exposed for more than 90 days.<sup>16,22</sup> Here, we evaluated the effects of MST-312 treatment for 140 days, what resulted in acquisition of resistance and changes of cell line characteristics. Long-term exposition is a well-known strategy to developing drug-resistant breast cancer cells,<sup>24,25</sup> what is usually due to acquisition of MDR phenotype. Whereas MST-312 is an epigallocatechingallate (EGCG) derivative, which is a substrate for MRP1,<sup>26</sup> we investigated its role in developing resistance, but until the point observed, the resistance was not mediated by MDR. Another possibility investigated was the development of an alternative mechanism of telomere maintenance, known as ALT, what is supposed to be inducible by anti-telomerase approaches,<sup>27,28</sup> but treated cells did not show an ALT phenotype.

Breast cancer cell lines have complex and heterogeneous karyotypes.<sup>29</sup> In fact, MDA-MB-231 cultures have high heterogeneity<sup>30</sup> and could easily undergo adaptation under long-term exposure to telomerase inhibitor by selection of long telomere cells. We observed an increase in relative telomeric DNA content in these cells simply by maintaining the culture for long period of time, but selective pressure promoted by MST-312 apparently enhanced this phenomenon. Changes in cell morphology and growth pattern also emphasize the idea of selection.



**FIGURE 4** Effects of MST-312 on chromosomes. A, Picture showing an example of crisis associated spread. B, Quantification of crisis associated spread on both MDA-MB-231(DMSO) and MDA-MB-231(MST-312) groups, which presented mitotic index (MI) of 3.17% and 2.73%, respectively. C, The relative telomeric DNA content (in median) for each group of MDA-MB-231 cells relative to the original cell line (\* $P < .05$ ; Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test)



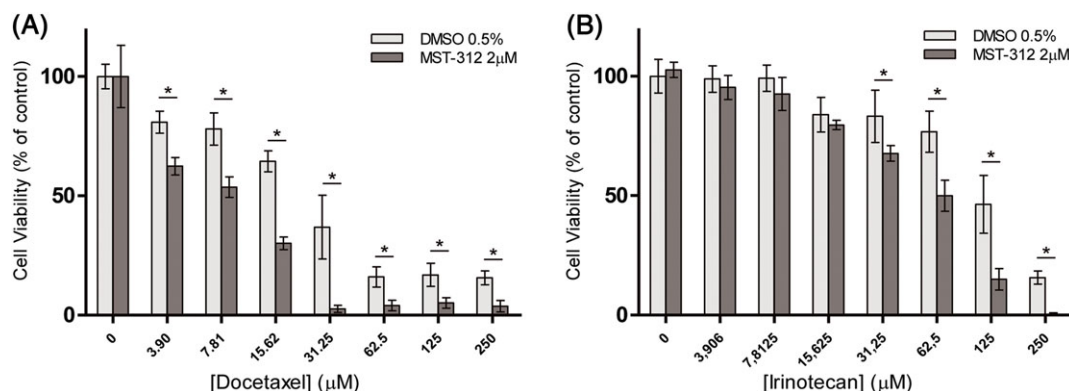
**FIGURE 5** Effects of long-term exposition to MST-312 on clonal MDA-MB-231 cells. A, Micrographs showing heterogeneity of MDA-MB-231 cells karyotype (top left) and homogeneity of clonal MDA-MB-231F9 cells karyotype. B, Graph showing proliferation pattern of original and clonal cell lines. DT values were 53.51 h (45.26-65.38) and 39.54 h (35.31-45.01), respectively. C, Analysis of cell viability performed by MTT assay after 72-h treatment with MST-312 at increasing concentrations in F9 clonal cells. Data are expressed as mean with SEM and relative to negative control (\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; one-way ANOVA followed by Dunnett's test). D, The long-term treatment with 2- $\mu\text{M}$  MST-312 showed significant change in growth of MDA-MB-231F9 clone cultures. Cells treated with the drug showed a lower proliferative profile after only 12 days of treatment when compared with control and virtually stopped proliferating after 20 days of exposition. E, Pictures showing the aspect of F9 cultures after 18-day exposition to 0.01% DMSO (left) and 2- $\mu\text{M}$  MST-312 (right)

Cultures of single-cell-derived clones can be used to reduce the heterogeneity of original cell line.<sup>30</sup> In order to test the hypothesis of selective pressure, clonal cultures were treated with MST-312, which was much more efficient against those homogeneous tumour cells, confirming that the potential to evade effects of persistent telomerase inhibition is related to selective conditions. In a previous work, it was demonstrated that long-term exposition to MST-312 also leads to resistance in human MCF-7 breast cancer cells but, in that case, by compensatory overexpression of telomerase,<sup>15</sup> showing that tumour heterogeneity provides a fertile soil for development of many resistance mechanisms.

Heterogeneous cultures reflect the intra-tumour heterogeneity (ITH), what is recognized as a big challenge for treatment of many

kinds of cancer, including breast cancer.<sup>31,32</sup> Whereas the effects of telomerase inhibition in tumour cells are expected only after many mitotic cycles, the development of resistance (by several mechanisms) can be a limiting factor for the use of these inhibitors on cancer therapy. Thus, it is important to take these facts into account when considering any anti-telomerase clinical approach. However, there are recent evidences of synergic action of MST-312 and other telomerase inhibitors on combination with classical drugs,<sup>21,33,34</sup> bringing new perspectives of use for this compound. In our work, the pharmacological potential of MST-312 as a prototype for adjuvant agent on therapy with classical drugs was demonstrated by associating this compound with docetaxel and irinotecan, two drugs frequently used in breast cancer therapy. In fact, because





**FIGURE 6** Effects of association of MST-312 with classical chemotherapy drugs on MDA-MB-231 cells. Analysis of cell viability performed by MTT assay after 48-h treatment of MDA-MB-231 cells with docetaxel (A) and irinotecan (B) plus MST-312 at subtoxic concentrations. Data are expressed as mean with standard deviation (SD) and relative to negative control (\* $P < .01$ , Two-way ANOVA followed by *Bonferroni post tests*). The  $IC_{50\%}$  values were estimated by nonlinear regression of the data. They are 22.51  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9441$ ) and 10.09  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9822$ ) for docetaxel groups with and without MST-312, respectively, and 111.86  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9433$ ) and 53.49  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.9815$ ) for irinotecan groups with and without MST-312, respectively

the noncanonical functions of telomerase were described, its transient inhibition has been implicated in deregulation of cell cycle kinetics and induction of apoptosis,<sup>35-37</sup> what can explain the synergic action.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Federal District Research Support Foundation (FAPDF) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### ORCID

Diêgo Madureira de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-6044-1954>

#### REFERENCES

- Nagi R, Patil DJ, Rakesh N, Jain S, Sahu S. Natural agents in the management of oral mucositis in cancer patients-systematic review. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2018;8(3):245-254.
- Ghasabi M, Mansoori B, Mohammadi A, et al. MicroRNAs in cancer drug resistance: basic evidence and clinical applications. *J Cell Physiol.* 2019;234(3):2152-2168.
- Gaspar TB, Sá A, Lopes JM, Sobrinho-Simões M, Soares P, Vinagre J. Telomere maintenance mechanisms in cancer. *Gene.* 2018;9(5):E241. <https://doi.org/10.3390/genes9050241>
- Ganesan K, Xu B. Telomerase inhibitors from natural products and their anticancer potential. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1):E13. <https://doi.org/10.3390/ijms19010013>
- Mokbel K. The evolving role of telomerase inhibitors in the treatment of cancer. *Curr Med Res Opin.* 2003;19(6):470-472.
- Xu Y, Goldkorn A. Telomere and telomerase therapeutics in cancer. *Genes.* 2016;7(6):E22. <https://doi.org/10.3390/genes7060022>
- Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, et al. Treating cancer by targeting telomeres and telomerase. *Antioxidants.* 2017;6(1):E15. <https://doi.org/10.3390/antiox6010015>
- Mender I, Gryaznov S, Shay JW. A novel telomerase substrate precursor rapidly induces telomere dysfunction in telomerase positive cancer cells but not telomerase silent normal cells. *Oncoscience.* 2015;2(8):693-695.
- Deville L, Hillion J, Pendino F, Samy M, Nguyen E, Segal-Bendirdjian E. hTERT promotes imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(5):711-719.
- Uziel O, Lahavan M. Conventional anticancer therapeutics and telomere maintenance mechanism. *Curr Pharm Des.* 2014;20(41):6452-6465.
- Zhou G, Liu X, Li Y, et al. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget.* 2016;7(12):14925-14939.
- Baerlocher GM, Leibundgut EO, Ottmann OG, et al. Telomerase inhibitor imetelstat in patients with essential thrombocythemia. *N Engl J Med.* 2015;373(10):920-928.
- Cully M. Trial watch: telomerase inhibitor shows promise in myeloproliferative disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(11):741.
- Man RJ, Chen LW, Zhu HL. Telomerase inhibitors: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016;26(6):679-688.
- Morais KS, Guimarães AFR, Ramos DAR, Silva FP, de Oliveira DM. Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2017;28(7):750-756.
- Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, et al. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(9):657-665.
- Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer.* 2011;10(1):96.
- Chiappori AA, Kolevska T, Spigel DR, et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(2):354-362.

19. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, et al. A pilot study of the telomerase inhibitor imetelstat for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2015;373(10):908-919.
20. Fuggetta MP, De Mico A, Cottarelli A, et al. Synthesis and enantiomeric separation of a novel spiroketal derivative: a potent human telomerase inhibitor with high in vitro anticancer activity. *J Med Chem*. 2016;59(19):9140-9149.
21. Ghasemimehr N, Farsinejad A, Mirzaee Khalilabadi R, Yazdani Z, Fatemi A. The telomerase inhibitor MST-312 synergistically enhances the apoptotic effect of doxorubicin in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1742-1750.
22. Gurung RL, Lim SN, Low GKM, Hande MP. MST-312 alters telomere dynamics, gene expression profiles and growth in human breast cancer cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2014;7(4-6):283-298.
23. Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cell through inhibition of telomerase activity and suppression of NF- $\kappa$ B pathway. *Tumor Biol*. 2015;36(11):8425-8437.
24. Alpsyoy A, Yasa S, Gündüz U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(3):351-355.
25. Li WJ, Zhong SL, Wu YJ, et al. Systematic expression analysis of genes related to multidrug resistance in isogenic docetaxel and Adriamycin-resistant breast cancer cell lines. *Mol Biol Rep*. 2013;40(11):6143-6150.
26. Hong J, Lambert JD, Lee SH, Sinko PJ, Yang CS. Involvement of multidrug resistance-associated proteins in regulating cellular levels of (-)-epigallocatechin-3-gallate and its methyl metabolites. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(1):222-227.
27. Cimino-Reale G, Gandellini P, Santambrogio F, Recagni M, Zaffaroni N, Folini M. miR-380-5p-mediated repression of TEP1 and TSPYL5 interferes with telomerase activity and favours the emergence of an "ALT-like" phenotype in diffuse malignant peritoneal mesothelioma cells. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):140.
28. Hu J, Hwang SS, Liesa M, et al. Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell*. 2012;148(4):651-563.
29. Davidson JM, Gorringer KL, Chin SF, et al. Molecular cytogenetic analysis of breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2000;83(10):1309-1317.
30. Khan GN, Kim EJ, Shin TS, Lee SH. Heterogeneous cell types in single-cell-derived clones of MCF7 and MDA-MB-231 cells. *Anticancer Res*. 2017;37(5):2343-2354.
31. Esparza-López J, Escobar-Arriaga E, Soto-Germes S, Ibarra-Sánchez MJ. Breast cancer intra-tumor heterogeneity: one tumor, different entities. *Rev Invest Clin*. 2017;69(2):66-76.
32. Stanta G, Bonin S. Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:85.
33. Chung SS, Oliva B, Dwabe S, Vadgama JV. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST-312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. *Int J Oncol*. 2016;49(2):487-498.
34. Tamakawa RA, Fleisig HB, Wong JM. Telomerase inhibition potentiates the effects of genotoxic agents in breast and colorectal cancer cells in a cell cycle-specific manner. *Cancer Res*. 2010;70(21):8684-8694.
35. Li Y, Tergaonkar V. Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Res*. 2014;74(6):1639-1644.
36. Thompson CAH, Gu A, Yang SY, Mathew V, Fleisig HB, Wong JMY. Transient telomerase inhibition with imetelstat impacts DNA damage signals and cell-cycle kinetics. *Mol Cancer Res*. 2018;16(8):1215-1225.
37. Wang X, Hu CS, Petersen B, et al. Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. *Blood Adv*. 2018;2(18):2378-2388.

**How to cite this article:** Morais K d S, Arcanjo D d S, Lopes GP d F, et al. Long-term in vitro treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells. *Cell Biochem Funct*. 2019;1-8. <https://doi.org/10.1002/cbf.3398>