



células proliferativas de tecidos renováveis, tais como células germinativas hematopoiéticas, linfócitos activados, células basais da epiderme e algumas células do intestino, embora em baixa concentração, pelo que estas células apenas apresentam um tempo médio de vida superior ao das células somáticas normais. Esta presença de telomerase nas células hematopoiéticas é crucial na resposta a grandes produções de células, aquando da eventual reparação de tecidos. Estudos de transplantes deste tipo de célula indicam um decréscimo de 0,4kb no comprimento telomérico do receptor, quando comparado com o dador. Sugerindo que a proliferação necessária para a reconstituição do novo sistema hematopoiético resulta num envelhecimento prematuro de cerca de 15 anos [2;3;8].

Em 2002 foi descoberto que a telomerase se encontra usualmente no nucléolo da célula, onde se julga decorrer a sua maturação, e só é libertada para o nucleoplasma quando se dá a replicação dos telómeros. Em células transformadas (células sem a restrição normal de crescimento), esta regulação compartimental da telomerase parece não existir, pois a enzima reside no nucleoplasma durante todo o ciclo celular. Este fenómeno parece atribuir uma vantagem de crescimento às células transformadas.

Esta hipótese de que a compartimentação selectiva da telomerase pode ser importante na estabilidade genómica foi reforçada após submeter ambos os tipos de células (normais e transformadas) a radiação ionizante. Verificou-se que em ambos os casos a telomerase se re-associou no nucléolo, tendo sido proposto pelos autores deste estudo que tal reassociação previne a adição de telómeros a extremidades de DNA resultantes da ionização. Tal descoberta sugere que a actividade da telomerase está sujeita a uma regulação talvez associável ao ciclo celular, oncoproteínas, e a DNA danificado [5;11].

O gene da telomerase foi identificado como 5p15.33, encontrando-se muito próximo do telómero. Este facto levantou questões quanto à sua proximidade poder estar relacionada com eventuais mecanismos regulatórios derivados do efeito da posição do telómero. Este efeito, deriva da forma estrutural do telómero, constituído por uma ansa em T.

Recentemente descobriu-se que a telomerase se pode organizar em dímeros ou múltímeros, sugerindo que esta enzima poderá agir sobre dois telómeros ao mesmo tempo *in vivo*, ou que esta dimerização permite ao substrato de DNA uma troca entre os promotores. Esta enzima, parece só estar regulada pelas proteínas adjacentes ao telómero aquando da iniciação da sua acção, e não durante a extensão telomérica. Parece também “preferir” adicionar longas extensões teloméricas em vez de várias curtas extensões a cada duplicação, pelo que pode não agir imediatamente após a primeira duplicação celular mas sim só quando os telómeros atingem um patamar crítico [8;12].

## Hipótese telomérica aplicada à extinção das espécies

Num artigo de 2004, Reinhard Stindl [13], propôs uma hipótese que relaciona o encurtar dos telómeros com a extinção total de determinada espécie. Considerando que o comprimento telomérico médio de cada espécie diminui gradualmente ao fim de várias gerações, a conclusão mais sensata será considerar que os telómeros começam compridos e vão ficando curtos. Encurtam de geração em geração por falta de telomerase durante o primeiro ciclo celular (explicado em [22]), devido aos níveis reduzidos de telomerase activa nas células germinativas adultas.

Como exemplo considere-se um humano com um telómero de 50kbp, uma perda de 5bp por geração, e um período de geração de 15 anos. Com estes dados conclui-se que a nossa espécie poderá viver 120000 anos sem fenótipos de encurtamento crítico dos seus telómeros. De referir que estes números são meramente especulativos e que serão necessárias mais experiências nesta matéria, contudo podemos ver que esta teoria detém um enorme potencial.

Sendo que existem grandes heterogeneidades entre o comprimento de telómeros numa mesma espécie, Stindl propôs que a reprodução entre diversas estirpes leva a este fenómeno, embora ainda não tenha sido registado *in vivo*. Um exemplo deste fenómeno poderá ser os ratinhos de laboratório, que apresentam enormes comprimentos teloméricos comparativamente aos ratinhos selvagens.

Esta teoria permite influenciar a teoria de Darwin, já que quando uma espécie atinge o patamar inferior de comprimento telomérico entra em declínio. Esse declínio pode levar à extinção dessa espécie, ou pode ser evitado por mutações cromossómicas (mais frequentes nesta fase) que poderão resultar numa, ou em várias novas espécies [13].

## Telómeros

Em 2000, Blackburn [6] escreve um artigo de extrema relevância. Foi proposto um modelo que relaciona os telómeros com a senescência celular, onde o conceito principal reside na estrutura dos telómeros. Considerou-se que um telómero é um complexo nucleoproteico dinâmico, podendo comutar entre 2 estados: protegido e desprotegido. Um telómero protegido, entende-se por ter a sua integridade física preservada permitindo a progressão da divisão celular, enquanto que um telómero desprotegido por muito tempo leva a respostas celulares como senescência.

Como já foi referido, tem-se associado o envelhecimento com o encurtar dos telómeros, já que estes limitam a proliferação celular. Estudos demonstram contudo que fibroblastos (células da pele, onde se verifica ausência de telomerase activa) de

peças velhas atingem senescência *in vitro* no mesmo tempo que fibroblastos retirados de pessoas novas, sugerindo que a limitação de proliferação celular *in vitro* não está somente relacionada com a idade. A hipótese telomérica de senescência supracitada, refere-se portanto a células sem telomerase activa, já que quando esta se encontra activa, o comprimento telomérico é restituído, nomeadamente nas células germinativas. De interesse referir que por vezes este comprimento é mesmo aumentado com a idade, nomeadamente em células do sistema imunitário humano. O comprimento dos telómeros depende muito de factores genéticos, pelo que para um mesmo tipo de célula, os telómeros de uma pessoa velha podem ser mais compridos que os telómeros de uma pessoa mais nova, pelo que não se deve comparar resultados cujas condições genéticas são diferentes. Estudos com leveduras e células humanas, demonstraram que a telomerase activa apresenta um efeito protector sobre telómeros muito curtos, que na sua ausência teriam levado as células ao estado senescente.

### Modelo de protecção dos telómeros

A função dos telómeros pode ser considerada como um método regulatório e canalizador do complexo reparador de DNA, que detecta até uma só falha na cadeia, numa resposta telómero-específica que mantém assim a sua integridade.

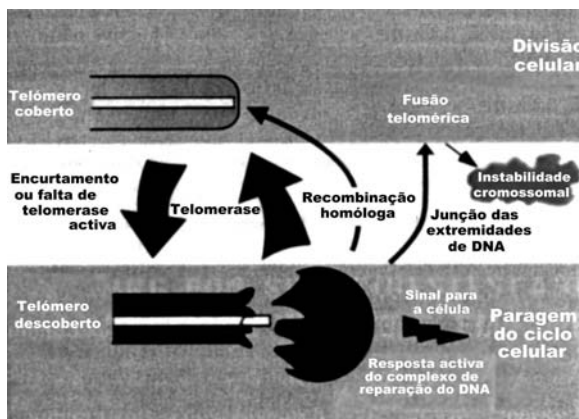


Fig. 2 – Comutação telomérica (adaptado de [6]).

A resposta à presença de um telómero desprotegido é a acção de telomerase, ou acção de recombinação homóloga, protegendo o telómero e/ou aumentando o seu comprimento de modo a poder prosseguir a divisão celular. Quando se dá fusão telomérica, já não existe sinal de perigo, contudo dá-se replicação de cromossomas fundidos levando a instabilidade cromossomal. Se não houver acção de protecção do telómero, a célula entra em senescência ou apoptose. Este processo permite que a telomerase activa mantenha a protecção de telómeros de tamanho

diminuto, não havendo fusão telomérica. A célula continua em divisão possivelmente por sinal da telomerase.

Este modelo associa as propriedades moleculares de um telómero e do seu comprimento, à sua protecção. Isto é, os telómeros mais compridos são probabilisticamente mais capazes de serem protegidos que os mais curtos.

A senescência celular tem sido descrita como um número finito de vezes que cada célula é capaz de se dividir, onde se dá senescência quando os telómeros atingem um tamanho crítico. Implicitamente, as células jovens não apresentam fenótipos velhos, reproduzindo-se todas por igual a uma grande velocidade, a não ser quando, após várias divisões, surgem telómeros de reduzido comprimento. Contudo, após uma análise quantitativa de células humanas e de ratinhos, verificou-se que as células somáticas residem em 2 estados, um em que se estão a dividir, e outro em que já não se dividem. Mesmo desde o início de vida são encontradas células em senescência. Este fenómeno aumenta de frequência com a idade até que a população inteira se encontra em senescência. De referir que mesmo no final de vida de uma população, as células que se encontram em divisão, dividem-se à mesma velocidade que as células se dividiam no início de vida. Em conclusão, a diferença entre uma população jovem e uma envelhecida reside na razão entre células em divisão e células em senescência.

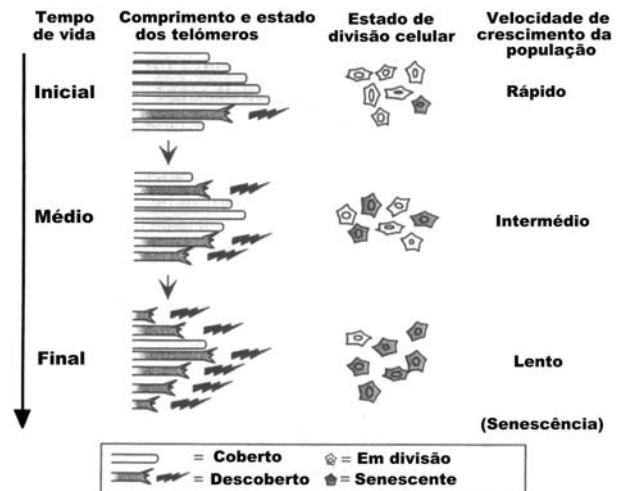


Fig.3 – Comportamento probabilístico dos estados teloméricos (adaptado de [6]).

Como representado na figura 3, neste modelo até os telómeros de maior comprimento possuem uma determinada probabilidade (embora inicialmente baixa) de serem desprotegidos, pois não existe telomerase activa. A ausência de telomerase reduz a probabilidade de re-protecção, pelo que a célula com telómeros desprotegidos entra em senescência. Como as subsequentes divisões celulares se dão em ausência de

telomerase, o comprimento telomérico global diminui, aumentando assim a probabilidade de se formarem telómeros desprotegidos e conseqüentemente células em senescência.

Este modelo explica diversas observações, nomeadamente como duas células humanas iguais podem apresentar potenciais proliferativos muito diferentes, mesmo possuindo telómeros de comprimento semelhante. Explica também o porquê do fenótipo envelhecido só se demonstrar nos ratinhos mTR<sup>-</sup> (ver detalhes mais abaixo) a partir da 6ª geração, em vez de se demonstrar logo nas primeiras gerações. O aparecimento de telómeros desprotegidos, e conseqüente senescência celular, depende portanto de vários factores, dos quais apenas um se refere ao comprimento telomérico [6].

Tomando este modelo como válido, foram feitas novas descobertas neste campo, pelo que se considera que os telómeros são na verdade caracterizados por repetições da sequência TTAGGG, ligados a um complexo de proteínas. Segundo o modelo apresentado acima, um telómero protegido apresenta-se sob a forma de um complexo de cromatina que protege fisicamente a extremidade 3' do cromossoma, ver figura 4. Possuem uma cadeia livre rica em guanina, de comprimento 150-200 bases, denominada cadeia-G, que se considera ter a capacidade de se dobrar, invadindo a região da cadeia dupla do telómero formando uma ansa, conhecida por ansa T, e formando ao mesmo tempo uma ansa na cadeia, denominada ansa D. Esta ansa D, resulta de um rearranjo molecular da cadeia G, formando uma estrutura secundária com repetições de quartetos G.

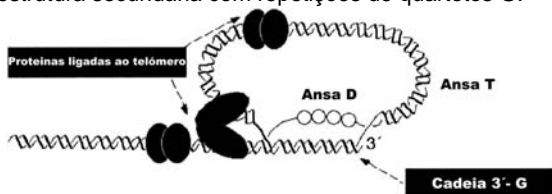


Fig.4 – Estrutura de um telómero protegido (adaptação de [10]).

Desta forma explica-se a entrada em senescência de uma célula com telómeros normais,

possivelmente devido a um erro na ligação das proteínas responsáveis pela protecção do telómero, ou pela acção de agentes externos como exposição a UV [10;14;15].

### Relevância dos telómeros no envelhecimento humano

Os humanos têm vindo a viver cada vez mais tempo, pelo que em 1900 a esperança média de vida era de 47,3 anos, em 1970 de 70,8 e em 1977 de 76,5 anos. Por volta de 2050 espera-se que pessoas com mais de 85 anos constituam 15% da população.

Como referido em [16], a biologia dos telómeros pode envolver mais do que a manutenção do seu comprimento e proliferação celular limitada, e os fibroblastos não apresentam boa relação entre idade do organismo e comprimento telomérico. Felizmente contudo, são várias as células nas quais essa relação existe, nomeadamente células do fígado e do rim e tecidos vasculares. Tendo contudo presente que dependendo do “uso” de cada tecido, diferente será a variação do comprimento telomérico, por exemplo, células submetidas a processos de cicatrização de feridas apresentam telómeros reduzidos face a células iguais que não sofreram dano.

Mesmo sabendo que nem sempre o comprimento telomérico indica a idade de um organismo, foi realizado um estudo comparativo entre o comprimento telomérico de eritrócitos de diversos animais, obtendo-se uma tendência que indica que as espécies com maior esperança média de vida apresentam redução telomérica menor a cada duplicação celular, por oposição a espécies com menor esperança média de vida [17].

Tentando correlacionar o encurtar dos telómeros com fenótipos de envelhecimento, apresentam-se na tabela 1 diversos resultados obtidos pela comparação entre tecidos que apresentam alterações e tecidos semelhantes sem alterações.

Tabela 1 – Características teloméricas em alterações associadas ao envelhecimento de humanos [16].

Fenótipo de envelhecimento	Características teloméricas <i>in vivo</i>
Decréscimo na capacidade cicatrizante	Diminuição do comprimento telomérico de fibroblastos com o envelhecimento
Decréscimo do sistema imunitário	Diminuição do comprimento telomérico em linfócitos B e T com o envelhecimento
Arteriosclerose	Diminuição do comprimento telomérico com a idade
Maior risco de desenvolver cancro	Actividade da telomerase e telómeros muito curtos em tecido cancerígeno
Declínio cognitivo	Não se verificou diminuição do comprimento telomérico nas células do cérebro
Cataratas	Não existem resultados
Osteoporose	Não existem resultados

Suspeita-se que a diminuição do comprimento dos telómeros nas células indicadas, está associada, como já referido, à extensiva replicação exigida pelos tecidos, de modo a compensar a perda de células. Foi provado em 2000 que o comprimento telomérico está inversamente relacionado com o grau de arteriosclerose.

Como descrito na tabela 1, existem células cujo comprimento telomérico não varia, no entanto estas envelhecem, por exemplo, as células nervosas. São tecidos caracterizados por não sofrerem mitose, no entanto apresentam uma pequena diminuição no comprimento dos telómeros com a idade. Esta diminuição deve ser encarada como diminuta, no entanto não deve ser ignorada, exigindo resposta noutros mecanismos [16].

### Disfunções genéticas e telómeros

Estudando síndromas de envelhecimento causados por deficiência genética, encontram-se semelhanças entre os efeitos causados por alguns síndromas e os efeitos causados por envelhecimento natural. Todos os síndromas com envelhecimento acelerado estudados (trissomia 21, síndrome de Hutchison-Gilford progeria, síndrome de Werner), apresentam alterações na biologia dos telómeros. Nomeadamente, o síndrome de Werner, possui patologias relacionadas com o envelhecimento natural, como a arteriosclerose, a osteoporose, a perda de cabelo, cataratas, diabetes, e predisposição para contracção de cancro. Verifica-se neste síndrome uma capacidade proliferativa reduzida *in vitro*, e uma diminuição acelerada do comprimento telomérico.

Num estudo com fibroblastos III-CF humanos do síndrome de Li-Fraumeni, contendo uma mutação num alelo do gene p53 (gene tumor supressor), verificou-se

que nas culturas imortalizadas, a fuga à senescência deveu-se à perda do alelo na forma selvagem do gene p53, ou à deleção homozigótica do gene p16<sup>INK4</sup>. Verificou-se também que as células imortais cujo gene p16<sup>INK4</sup> foi eliminado não apresentaram propriedades tumorígenas, pelo que se associa este gene à fuga da senescência em vez de se associar à progressão de um eventual estado cancerígeno. Verificou-se também que este gene se apresenta como uma via genética alternativa à perda de função do gene pRb.

De referir que as perdas simultâneas do gene p53 e do gene p16<sup>INK4</sup>, ou do gene p53 e p110<sup>Rb</sup>, não são suficientes para a imortalização, sendo que este estado apenas é atingido quando se observam telómeros de alto peso molecular e de comprimento estabilizado, quer por reactivação da enzima telomerase quer por outro mecanismo, denominado ALT, que se pensa estar relacionado com processos de recombinação de DNA [7], [16].

A desordem “dyskeratosis congenita” (DKC) é uma deficiência genética humana, onde se acredita ser causada por um defeito na manutenção dos telómeros. Tem como fenótipos principais a curta longevidade dos pacientes, cabelo cinzento, doenças pulmonares, dificuldades na aprendizagem, e propensão para contrair cancro. Num estudo comparativo entre esta doença (DKC) e ratinhos com telomerase sem a subunidade RNA (mTR; impedindo assim a sua actividade), foram encontradas semelhanças relacionadas com envelhecimento. Os ratinhos utilizados foram só os da 6ª geração de ratinhos sem telomerase activa pois apenas estes começaram a apresentar sintomas de telómeros reduzidos (os ratinhos iniciais possuíam telómeros de grande comprimento, pelo que a ausência de telomerase não produziu nenhum efeito) [3;18]. Sendo assim, a tabela 2 resume os resultados:

**Tabela 2 – Comparação dos fenótipos de envelhecimento, DKC e ratinhos mTR<sup>-</sup>**

Fenótipo	Envelhecimento humano	DKC	Ratinhos 6ª geração mTR <sup>-</sup>
Tempo médio de vida reduzido	Não aplicável	+	+
Reduzida capacidade de cicatrização	+	+	+
Perda de cabelo e cabelo cinzento	+	+	+
Aumento de incidentes cancerígenos	+	+	-
Telómeros curtos	+	+	+

Dados retirados de [10] e [18]

Existem estudos que indicam a reparação de telómeros muito curtos em ratinhos, através do uso da re-introdução da telomerase, provando assim que a telomerase é capaz de reconhecer tais telómeros reduzidos, e de os reconstituir, prevenindo fusões cromossómicas e fenótipos envelhecidos. Estes estudos colocam a possibilidade da utilidade da re-introdução da telomerase como combate a síndromas de

envelhecimento e até combate a patologias associadas ao envelhecimento.

A reactivação da telomerase poderá aumentar o tempo médio de vida das células *in vivo*, mas este pode não ser o único efeito numa célula, pelo que ainda faltam muitos estudos. Poderá ser utilizada como cura para inúmeras doenças como arteriosclerose, cirrose do fígado, diabetes, disfunções neurológicas, etc. Em termos de envelhecimento, parece útil a re-activação da

telomerase pois dessa forma atrasa-se ou previne-se o envelhecimento. Mas esta opção torna-se oposta quando se fala de cancro [10;16].

### Mecanismo alternativo de manutenção do comprimento telomérico (ALT)

Este mecanismo é explicado com base num modelo no qual uma cadeia de DNA de um telómero se liga a uma cadeia complementar de outro telómero, obtendo assim o molde para a síntese de novo DNA telomérico (ver figura 5).

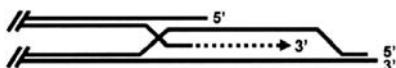


Fig. 5 – Mecanismo alternativo proposto para alongamento da cadeia telomérica [19].

Após crise celular, alguns telómeros ficam tão pequenos que as repetições teloméricas se encontram logo após a zona subteloimérica do cromossoma, onde já não existem as repetições da sequência telomérica. Quando se dá o mecanismo ALT, eventuais sequências TTAGGG perdidas nas zonas subteloiméricas podem agir como primer da adição de novo DNA telomérico,

resultando assim na substituição das variações subteloiméricas por repetições teloméricas TTAGGG.

Este mecanismo verifica-se em vários tipos de tumores epiteliais, nomeadamente osteossarcoma, sarcoma de tecido mole, glioblastoma multiforme, carcinoma das células renais, supra-renaloma, carcinoma da mama e carcinoma dos ovários.

Existem tumores onde se verificam ambos processos de manutenção dos telómeros, ALT e telomerase. Os telómeros mantidos pelo mecanismo ALT apresentam elevada heterogeneidade (i.e. comprimentos que variam bastante entre si), e são observados em células que também apresentam actividade da telomerase. Este fenómeno pode dever-se a heterogeneidade tumoral, onde algumas células recorrem ao mecanismo ALT, enquanto que outras desfrutam de telomerase activa. Existem provas que apontam para tal fenómeno, concretamente um caso de um tumor cerebral telomerase positivo que foi tratado com inibidores da telomerase regrediu, mas após um período de tempo voltou a desenvolver-se, apresentando obviamente inactividade da telomerase mas comprimento telomérico característico do mecanismo ALT. Este caso parece subscrever a teoria de que podem existir tumores onde coexistam os dois mecanismos de manutenção do comprimento dos telómeros.

Tabela 3 – Deficiências teloméricas que podem promover a oncogénese [20]

Deficiência telomérica	Mecanismos associados	Resultantes
Aumento da manutenção do seu comprimento por prevenção da diminuição deste	Activação da telomerase ou ALT	Imortalização celular e cancro
Aumento da manutenção do seu comprimento por menor diminuição deste	Superactividade da telomerase ou ALT em tecidos normais	Expansão clonal de células com mutações oncogénicas
Diminuição do comprimento acelerada	Actividade da telomerase e ALT inadequadas	Falha na proliferação, especialmente em tecidos com alta velocidade de proliferação; fenótipos de envelhecimento
Eventos de reparação de DNA inadequados	Diminuição telomérica excessiva; Falha na protecção telomérica	Instabilidade genómica

Este mecanismo alternativo é também descrito como presente em algumas células somáticas normais, fruto de estudos com os ratinhos mTR<sup>-/-</sup>, onde foi visto crescimento telomérico mesmo sem presença de telomerase activa [20].

### Relevância do stress oxidativo no envelhecimento

Outro processo ainda não referido de envelhecimento pode estar envolvido nas células, o envelhecimento por stress oxidativo, onde geralmente se verifica uma relação inversa entre o tempo médio de vida de um organismo e a sua velocidade metabólica. Este fenómeno pode danificar todos os componentes celulares, incluindo DNA mitocondrial e nuclear. Esse

dano é mais notável nas extremidades teloméricas do DNA nuclear pois esta zona de DNA possui menos mecanismos de reparação.

Referindo de novo a relação entre o “uso” celular e o envelhecimento, temos o exemplo da pele humana, que sofre envelhecimento acelerado por factores externos, como por exemplo exposição a raios UV. Esta exposição, promove a formação de espécies oxidantes, concretamente as “reactive oxygen species” (ROS), que atacam maioritariamente as cadeias de DNA, como referido no parágrafo anterior. Estas espécies estão envolvidas no desenvolvimento de muitas patologias, como arteriosclerose, cancro e reacções inflamatórias.

A quantificação de ROS produzidos num sistema celular (geralmente radicais hidroxil, derivados do meio aquoso celular) é muito difícil, pois são espécies com

constantes de velocidade reaccional da ordem de  $10^9$ , sendo por isso de concentração muito baixa.

Diversas experiências provam a correlação entre o metabolismo e a produção de ROS, já que um dos produtos do ataque radicalar aos organelos é a lipofuscina, podendo esta ser quantificada. Um exemplo disso deriva do enclausuramento de moscas, que reduz o seu movimento, aumentando o seu tempo médio de vida e diminuindo a acumulação de lipofuscina.

Um método simples de verificar o efeito do stress oxidativo na esperança média de vida dos organismos, baseia-se no uso de anti-oxidantes. Como exemplo, verifica-se o aumento (13%) do tempo médio de vida de nemátodos pelo consumo prolongado de vitamina E. Contudo, a aplicação de outras moléculas como cloranfenicol ou brometo de etídeo (agentes que agem a nível da cadeia de DNA, e não como anti-oxidantes) levam ao aumento do tempo médio de vida destes organismos em 1100%, relevando que o envelhecimento causado pelo stress oxidativo não é muito significativo.

As enzimas de protecção contra os ROS ("ROS scavenging enzymes"), possuem um importante papel no prolongamento da vida de um organismo pois através da sua inibição, nomeadamente através da inibição da superóxido dismutase, é aumentada a sensibilidade ao stress oxidativo e é reduzido o tempo médio de vida.

A cadeia respiratória nas membranas mitocondriais é dos maiores produtores de espécies oxidantes no organismo, sendo que se produz cerca de 1% de  $H_2O_2$  ( $2 \times OH^{\cdot}$ ) para cada molécula de piruvato consumida. A inibição dos complexos I e III resultam num aumento dramático da produção destas mesmas espécies, revelando que uma deformação na cadeia respiratória é perigosa para uma célula. Por outro lado, a inibição da síntese de ubiquinona (o transportador de electrões entre o complexo I/II e III) prolonga a vida em 50% e reduz a produção de espécies oxidantes [1;15;16;21;22].

Diversos autores consideram a produção de ROS como a maior causa de envelhecimento, pelas seguintes razões: **1.** A produção de ROS é constante e presente na actividade celular; **2.** Os radicais livres são espécies altamente reactivas e podem originar lesões graves no DNA; **3.** A manipulação de funções da cadeia respiratória produz efeitos significativos na esperança média de vida; **4.** A manipulação das defesas anti-oxidantes produz grandes alterações na esperança média de vida; **5.** A restrição calórica prolonga o tempo médio de vida e diminui a produção de ROS; **6.** Muitos metabolismos regulatórios que prolongam o tempo médio de vida, também afectam a produção de substrato da cadeia respiratória [1].

## Envelhecimento como agente anti-cancerígeno

A imortalização, ou aquisição da capacidade de sofrer ilimitados duplicares de população, é um importante aspecto da biologia das células cancerígenas. É o fenótipo imortal das inúmeras células cancerígenas que as distingue das células somáticas normais, que se dividem um número finito de vezes (40 a 70, [3]) antes de entrar em senescência. Existem pelo menos 2 formas de senescência celular que controlam o tempo médio de vida de uma célula, denominados M1 e M2 (fase de Mortalidade 1 e 2), sendo o início de cada estágio determinado pelo comprimento telomérico:

**Fase M1** – Esta fase é induzida quando o comprimento telomérico é menor que um determinado valor, estando dependente dos genes tumor supressor p53/p21 e p16/pRb. Se uma célula for infectada com oncogenes virais (capazes de inibir ambos os supressores), por exemplo o SV40 LTag, começa a proliferar um número finito de vezes para além do qual as células normais entram em senescência já que os genes p53 e pRb se encontram inibidos, mas esta fase geralmente acaba em morte de todas as células da população já que os telómeros continuam a diminuir de tamanho a cada replicação.

**Fase M2** – Esta fase é caracterizada por um estado crítico das células, onde se observa morte celular generalizada, derivada por fusão cromossómica fruto de telómeros destapados. Por vezes, uma subpopulação de células em proliferação consegue escapar a esta crise, originando uma cultura de células imortais, embora seja um evento de baixa probabilidade, 1 em  $10^5$ . Esta fase é caracterizada por células de telómeros muito curtos, mas de comprimento estabilizado, graças à actividade da telomerase, ou de mecanismos alternativos de aumento telomérico (ALT) que utilizam recombinação e cópias de outros telómeros [3;7;8;9].

Apesar de todos os passos que originam cancro não estarem conhecidos, considera-se que o processo que leva a um estado cancerígeno requer a acumulação de uma série de alterações genéticas, e uma hipótese emergente, afirma que a regulação positiva ou re-expressão da telomerase pode ser necessária para o crescimento contínuo das células tumorígenas, ver tabela 5. Isto porque é detectada mais de 85% de telomerase activa em células cancerígenas, sugerindo que as fases M1 e M2 são importantes supressores de tumor. O processo de carcinogénese é composto por diversos passos, necessitando de alterações sucessivas num número de genes. Cada passo envolve a alteração de um gene, e a expansão clonal da célula mutante. Ora se as fases M1 e M2 estiverem activas, a progressão de cada célula mutante está altamente dificultada pois é mais provável que a célula entre em senescência.

Segundo este modelo, a actividade da telomerase permitirá a uma célula escapar aos limites impostos pelas fases M1 e M2, permitindo assim a

expansão clonal das células cancerígenas, e o subsequente crescimento de tumor e eventuais metástases [2;9].

**Tabela 5** – Actividade da enzima telomerase detectada em células cancerígenas humanas [3].

Células	Casos Positivos/ Casos Testados	Telomerase activa (%)
Normais*	1/196	0,5
Preinvasivas (benignas)	125/410	30
Malignas	1734/2031	85
Adjacentes a malignas	77/660	11

\*Células de tecidos renováveis, que apresentam baixa, mas detectável concentração de telomerase activa  
Valores obtidos em 1997 através da técnica TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)

Em contraste com as células normais, as células tumorígenas não apresentam perda de comprimento dos telómeros em cada divisão celular, sugerindo que a estabilidade telomérica poderá ser necessária para que as células saiam do estado de replicação senescente e proliferem indefinidamente. A imortalização pode ocorrer através de uma mutação de um gene na via de repressão da telomerase, permitindo a expressão da telomerase nas células cancerígenas.

Através dos dados da tabela 5, espera-se um dia utilizar a detecção de telomerase activa como método de diagnóstico de cancro, e ainda como método de pre-diagnóstico, já que previne a proliferação de cancro por metástase, pois é detectada em mais de 10% de amostras de células vicinais a células tumorígenas. Devido à ligação entre proliferação celular e telomerase activa, a inactivação desta enzima poderá ser um potencial tratamento na luta contra o cancro.

Um caso conhecido de diagnóstico clínico determinado através da actividade da telomerase é a neuroblastoma infantil, onde são encontrados elevados níveis de telomerase activa na fase 4 da doença, identificando mau prognóstico. Contudo, a fase 4s desta doença (uma forma dissimulada da doença) apresenta frequentemente regressão espontânea [3]. Nesta forma da doença, não se verificam quase níveis de telomerase activa, e os telómeros são muito curtos sugerindo que a incapacidade de manter os telómeros faz regredir a doença. Este estudo indica por sua vez que o estado cancerígeno não requer a presença de telomerase activa, mas sim um mecanismo capaz de manter o comprimento telomérico estável, que garanta um crescimento a longo prazo do tumor.

A telomerase não é nenhum oncogene, nem origina cancro. Pode sim, por prolongar o tempo médio de vida das células, levar a eventuais mutações genéticas, originando cancro.

Estudos relatam fibroblastos e células do endotélio (mortais) capazes de se multiplicarem mais de 300 vezes, pela introdução de telomerase [3]. Estas células são indistinguíveis de células novas, quer bioquímica quer citogeneticamente. Mantêm a capacidade de restaurar DNA danificado através do aumento de função do gene p53 e através da cessação

de replicação. Um dos factores marcantes para uma célula ser cancerígena, é a presença de aberrações cromossómicas, sendo que as células estudadas não apresentam quaisquer aberrações características de células tumorígenas.

Numa tentativa de produzir células tumorígenas a partir das células supracitadas, infectou-se estas células com oncogenes, e verificou-se que nenhuma desenvolveu cancro. Este estudo afirma portanto que a expressão da telomerase protege as células de instabilidade genómica associada aos telómeros (suportando a teoria da protecção de telómeros), um factor determinante na transformação celular e progressão cancerígena [2].

Na sua tese de "Master of Philosophy" [23], Wong SCH afirma em 1998, que não existe relação directa entre a inibição de crescimento e actividade da telomerase em células cancerígenas. Afirma ainda que a inactividade desta enzima pode não estar necessariamente envolvida na senescência celular.

### Outras funções da enzima telomerase

Por oposição ao referido acima, em 2001 refere-se que os fenómenos de transformação celular, e imortalização, podem não ser independentes. Esta afirmação é suportada por outras observações, que referem a não transformação de células após infecção de oncogenes sem presença de telomerase e que a inibição da telomerase em ratinhos previne a formação de tumores a partir da infecção com células cancerígenas (ver tabela 2). Outros estudos usando células tumorígenas de ratinhos como modelo, demonstraram haver telomerase activa antes de se dar encurtamento telomérico, sugerindo que o tumor utiliza alguma propriedade da telomerase, que não só a capacidade de replicação imortal.

Uma hipótese emergente refere novamente que a telomerase age como promotor de tumor independentemente dos telómeros. Esta hipótese advém de um estudo em fibroblastos humanos que expressam um mecanismo de manutenção telomérico alternativo (ALT, ver abaixo), e que foram contaminados com oncogenes, mas que apenas apresentam fenótipo

tumorígeno após introdução de telomerase, telomerase essa que foi alterada de modo a não permitir o alongamento telomérico [9;20;24].

## Potencial terapêutico

### Inibidores de Telomerase

Considerando que a actividade da telomerase é necessária para a progressão de um estado cancerígeno, foram criadas moléculas inibidoras desta enzima, nomeadamente RNA "anti-sense" oligonucleotídeos, inibindo a subunidade hTR. Após um determinado número de duplicações, as células cancerígenas irão eventualmente atingir senescência ou crise celular. Estes dados identificaram a telomerase como um alvo ideal para novas terapêuticas.

Temos vindo a verificar o contínuo estudo nesta área, pelo que em 2002 foi provado que estes oligonucleotídeos, nomeadamente 2'-metoxietil RNA (MOE), são capazes de entrar nas culturas cancerígenas, provocar a diminuição do comprimento telomérico, e reduzir a proliferação celular. Estes oligonucleotídeos apresentam baixa toxicidade em humanos, alta estabilidade *in vivo* e apresentam baixos custos de síntese. O facto de estes oligonucleotídeos conseguirem penetrar na célula, refuta a afirmação de que tal só é possível com a ajuda de lípidos.

Moléculas cujo alvo é a subunidade catalítica da telomerase, hTERT, também têm sido estudadas, embora apresentem resultados semelhantes aos direccionados à subunidade hTR.

Foi uma descoberta extremamente promissora no campo da luta contra o cancro pois não só promove bons resultados, como é uma terapia simples e que requer baixa concentração de fármaco. Aguardamos contudo por testes que validem a ausência de efeitos secundários.

Considerando os inibidores da telomerase como agentes anticancro, deve-se ter em conta 2 factores:

**Tempo de acção** – Será de esperar um determinado intervalo de tempo entre a administração de um inibidor da telomerase e a senescência das células cancerígenas, já que este factor depende do tamanho inicial dos telómeros, que sem telomerase, irão diminuindo ao longo das duplicações. É o exemplo da terapia com MOE (supracitado) que demora cerca de 100 dias até que as células tumorígenas atinjam apoptose. Como tal, a telomerase não deve resultar como cura rápida para o cancro, mas sim como terapia pós tratamento, prevenindo a formação de micrometástases.

**Inibição de telomerase em células regenerativas** – Como não se pode redireccionar a acção dos inibidores para a telomerase presente nas células cancerígenas, a eventualidade de inibição desta enzima nos tecidos

normais humanos regenerativos (células germinativas hematopoiéticas, linfócitos activados, células basais da epiderme etc.) pode levar a danos irreversíveis. Contudo, como as células cancerígenas devem apresentar telómeros de tamanho mais reduzido que estas células normais, os inibidores devem apresentar menor efeito nas células normais.

Outra possibilidade de inibir a telomerase baseia-se no uso de "hammerhead ribozymes". São pequenas moléculas de RNA, cataliticamente activas. Os primeiros testes direccionados à subunidade hTR revelaram redução da actividade telomérica mas não apresentaram nenhum efeito na capacidade proliferativa tumorígena. Por outro lado, em testes direccionados à subunidade hTERT, foi verificado que esta riboenzima promove não só o corte do mRNA da subunidade hTERT levando à diminuição do comprimento telomérico, impede a proliferação e induz apoptose, como também aumenta a sensibilidade do tumor para inibidores da topoisomerase II. Mostrou-se também que em aplicações adenovirais de riboenzimas anti-hTERT a apoptose foi imediatamente induzida, independentemente do comprimento telomérico, e não foi associada à diminuição destes. Contudo, são poucos os testes que provam este fenómeno *in vivo* [9;14;25].

Numa conferência em Abril de 2003 co-organizada por Jerry W. Shay, foi apresentada uma vacina pela corporação Geron [26]. Trata-se de um oligonucleotídeo inibidor da telomerase, denominado GRN163, cujo alvo é a subunidade *terc*, sendo por isso altamente específica. Os resultados após 6 vacinações têm sido positivos, embora falte a confirmação por testes em humanos.

### Inibidores de Telómeros

**Quartetos-G** – Estas estruturas ricas em guanina aparentam ter um papel importante na protecção dos telómeros. Desta forma, fármacos que estabilizam estas estruturas evidenciam inibição do papel da telomerase, já que esta perde capacidade para alongar o telómero aquando da replicação. Compostos diferentes como porfirinas e amidoantracenos demonstraram agir sobre estas estruturas [14].

### Quimioterapia e telomerase

Como já referido, as células do epitélio de portadores do síndrome de Li-Fraumeni apresentam uma mutação no gene p53 (tumor supressor) levando à sua ausência fenotípica. Como tal, estas células têm tendência a adquirir fenótipo imortal, o qual pode ser alterado pelo uso de oligonucleotídeos. Desta forma, estes agentes beneficiam o paciente numa vertente de prevenção de formação de tumores [8].

Infelizmente, os modelos animais utilizados como previsão do efeito destes fármacos têm sido ratinhos, animais com telómeros muito compridos e mecanismos diferentes, não sendo modelos adequados à previsão deste efeito em humanos. Um exemplo de diferenças nos mecanismos entre os humanos e os ratinhos reside na inibição dos genes necessária para ultrapassar a fase M1. Nos ratinhos basta inibir o gene pRb ou o gene p53 enquanto que em células humanas é necessária a inibição simultânea destes dois genes e a inibição do caminho de encurtamento telomérico [4]. A mosca *Drosophila melanogaster* também é utilizada como cobaia de testes genéticos, mas apresenta telómeros muito diferentes dos humanos, contendo repetições teloméricas muito longas, e não apresenta telomerase activa pelo que não serve como alvo de estudo. O nemátodo *Caenorhabditis elegans* [27] é frequentemente utilizado como alvo de comparação pois possui telómeros semelhantes, embora mais pequenos, e suspeita-se apresentar telomerase activa *in vivo*. Outros mamíferos como porcos, carneiros e vacas poderão ser alvo de estudo, mas não antes de se verificar se apresentam telómeros de estrutura e comprimento semelhante aos humanos, se o padrão de expressão da telomerase é semelhante aos humanos, e se a replicação é limitada pelo comprimento telomérico.

Em todo o caso actualmente começa-se a recorrer a técnicas de recriação de modelos humanos por engenharia genética, onde se acredita desenvolver fontes para resultados fidedignos. Contudo estas técnicas ainda estão no início, sendo que os resultados obtidos até agora não são exactamente iguais aos verificados *in vitro* [28].

Sendo assim, o envelhecimento e formação de cancro associados à telomerase (e telómeros) devem-se resumidamente a: **1.** Perda progressiva dos telómeros aquando da divisão de células normais, podendo essa perda ser o "relógio" que regula a senescência celular; **2.** Ocorrência de senescência celular resultante do diminuto tamanho dos telómeros; **3.** Ocorrência de mutações na via de repressão da telomerase, havendo reactivação desta; **4.** Estabilização do comprimento dos telómeros e subsequente imortalização celular; **5.** Proliferação celular e progressão para um estado cancerígeno.

Desta forma, a formação de tumores é um evento raro, já que necessita de cumprir todos os pré-requisitos supracitados, sendo a sua taxa de incidência de 0,4% nos humanos. Contudo, se diminuirmos o espectro de indivíduos, verificamos que para humanos de idade superior a 65 esta taxa sobe para 2,2% [2], [8].

## Metilação do DNA [29]

A metilação da cadeia de DNA é um mecanismo envolvido na regulação da expressão génica, aquando do desenvolvimento de uma célula. Em eucariontes, a metilação é descrita pela adição de um grupo metil ao carbono 5 de uma citosina, maioritariamente nas zonas de sequências CG. Esta metilação, pode levar a mutações por isomeria, onde a citosina é substituída por uma timina. Estudos nesta matéria, demonstraram que este fenómeno está associado ao envelhecimento e à promoção de estados cancerígenos, pelo que a progressão tumorigénica é frequentemente associada a alterações nos padrões de metilação derivados desse envelhecimento, embora sejam alterações muito díspares em cada tipo de cancro. Este processo ganha importância não só porque modula a expressão génica (nomeadamente a expressão de genes supressor de tumor), mas também porque afecta a estabilidade cromossómica. É um fenómeno que pode explicar como a variação de diversos factores, nomeadamente alimentação, podem afectar o risco de cancro e envelhecimento.

O envelhecimento nos mamíferos está associado a alterações na quantidade e padrões de metilações da cadeia de DNA. Verificou-se que a desoximetilcitosina (dMC) total diminui com a idade (em organismos como o salmão, ratinhos e humanos), pelo que este mecanismo foi também proposto como outro mecanismo de contagem decrescente para atingir a senescência celular. O elevado teor de segmentos GC na zona do promotor da hTERT, parece indicar que a metilação do DNA controla a expressão da telomerase.

Verifica-se uma metilação de DNA deficiente na maior parte dos cancros, nomeadamente do cólon, pulmão, próstata e mama. Esta desordem na metilação é verificada em organismos mais envelhecidos, onde a probabilidade de mutações é acrescida, pelo que se justifica a maior taxa de incidência de tumores nesta faixa etária.

A nutrição é um factor que é também associado a alterações na metilação de DNA, quer no desenvolvimento quer na ocorrência de doenças. É habitualmente aceite que a dieta de determinado indivíduo afecta a sua saúde, onde o consumo de fruta e vegetais parece diminuir o risco de contrair cancro tal como a diminuição do consumo de calorias, que também é reconhecida como um método efectivo de diminuir a taxa de envelhecimento. O consumo excessivo de álcool parece alterar a metilação do DNA em diversos órgãos, incluindo o fígado, esófago, cólon e útero.

## Conclusão

Todos os mecanismos descritos têm como ponto comum a exposição da cadeia G livre do telômero, resultante da abertura da ansa T. A figura 6 tenta esquematizar (embora de forma redutora) todos estes processos.

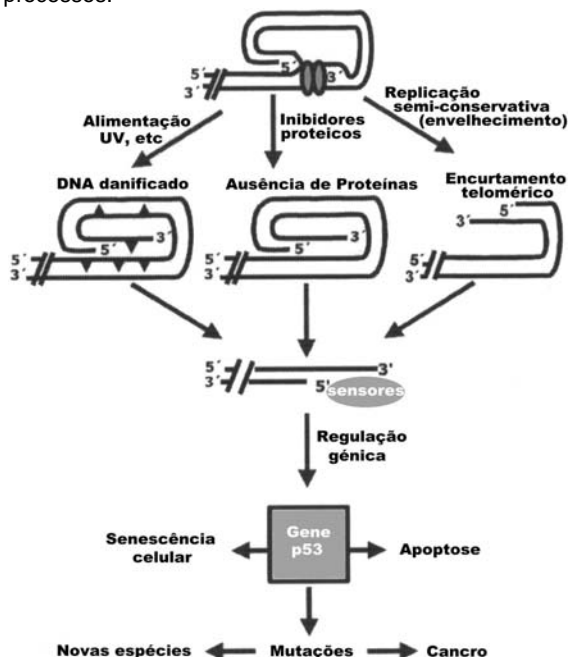


Fig. 6 – Resposta celular à exposição da cadeia G livre (adaptação de [15])

Como se pode verificar pelo esquema, todos os mecanismos de desproteção do telômero promovem, ou o envelhecimento (por apoptose ou senescência celular), ou o aparecimento de células tumorígenas, ou a formação de novas espécies (pela hipótese telomérica da extinção das espécies).

A compreensão do envelhecimento, à luz dos mecanismos biológicos, tem sido um assunto bastante revisto pelos investigadores. É talvez neste assunto que reside o maior tesouro que alguém poderá encontrar, a imortalidade. Contudo, como foi visto ao longo deste artigo de revisão, o caminho para a resposta final apresenta-se atribulado, onde poucas certezas existem e onde a influência tumorígena tem um grande peso. Desde stress oxidativo a telômeros de tamanho reduzido, passando por inúmeros mecanismos, o envelhecimento apresenta-se como um complexo sistema de regulação cuja função principal é, ironicamente, a sobrevivência.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Abel Vieira, pela disponibilidade na cedência de literatura, primária e secundária, com elevada relevância no âmbito deste trabalho,

nomeadamente sobre radicais livres. Do mesmo modo gostaria de agradecer à Professora Elvira Gaspar, por nos ter aberto portas para um novo mundo de informação. Também importante foi a disponibilidade de diversos colegas de medicina e biotecnologia em resposta a várias dúvidas sobre uma área que, para mim, não era familiar.

## Literatura citada

- [1] – Larsson NG, Dufour E, *Understanding aging: revealing order out of chaos*, BBA, 1658: 122-132, **2004**
- [2] – Shay JW, *Telomerase in Human Development and Cancer*, Journal of Cell. Phys. 173:266-270, **1997**
- [3] – Shay JW, Holt SE, *Role of Telomerase in Cellular Proliferation and Cancer*, J. Cell. Physiol., 180:10-18, **1999**
- [4] – Chevillard S, Petitot F, Lebeau J, Dano L, Lectard B, Altmeyer S and Levalois C, *In vitro aging of rat lung cells: Downregulation of telomerase activity and continuous decrease of telomerase length are not incompatible with malignant transformation*, 286:30-39, **2003**
- [5] – Mankouri HW, *Regulating telomerase*, Tr. Mol. Med., 8:12:547, **2002**
- [6] – Blackburn EH, *Telomere states and cell fates*, Nature, 408:53-56, **2000**
- [7] – Reddel RR, Rogan EM, Maclean K, Chang ACM, *Genetic changes during immortalization of human cells*, Rad. Onc. Invest., 3:299-306, **1996**
- [8] – Shay JW, Wright WE, Granger MP, *Telomerase in cancer and aging*, Crit. Rev. Onc. Hem., 41:29-40, **2002**
- [9] – Lee K, Ouellette M.M., *Telomerase: diagnostics, cancer therapeutics and tissue engineering*, DDT, 6:23 1231-1237, **2001**
- [10] – Blasco MA, *Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair*, Eur. J. Cancer, 38:2222-2228, **2002**
- [11] – Lewin B, *Genes VII*, Oxford University Press, Oxford, **2000**
- [12] – Lue NF, *Adding to the ends: What makes telomerase processive and how important is it?*, BioEssays, 26: 955-962, **2004**
- [13] – Stindl R, *Is Telomere Erosion a Mechanism of Species Extinction?*, Mol Dev Evol, 302B:111-120, **2004**
- [14] – Saretzki G, *Telomerase inhibition as cancer therapy*, Cancer Letters, 194:209-219, **2003**
- [15] – Gilchrist BA, Kosmadaki MG, *The role of telomeres in skin aging/photoaging*, Micron 35:155-159, **2004**
- [16] – Klapper W, Parwaresch R, Krupp G, *Telomere biology in human aging and aging syndromes*, Mech Ageing Dev., 31:122(7):695-712, **2001**
- [17] – Vleck CM, Haussmann MF, Vleck D, *The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process*, Exp. Ger., 38:791-795, **2003**

[18] – Marciniak RA, Johnson FB, Guarente L, *Dyskeratosis congenital, telomeres and human ageing*, Trends Genet., 16(5):193-5, **2000**

[19] – Tomaska L, McEachern MJ, Noske J, *Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles*, FEBS Letters, 567: 142-146, **2004**

[20] – Reddel RR, *Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer*, Cancer Letters, 194:155-162, **2003**

[21] – Françoise Nepveu, et al., *Antioxidant Properties of trans- $\epsilon$ -Vineferin As Compared to Stilbene Derivates in Aqueous and Nonaqueous Media* – J. Agric. Food Chem., 50:1213-1217, **2002**

[22] – Halliwell B and Gutteridge JMC, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2<sup>nd</sup> Edition, Clarendon Press – Oxford, **1989**

[23] – Wong SCH, *Regulation of Telomerase in Human Cancer Cells*, University of Hong Kong, **1998**

[24] – Hahn WC, Blasco MA, *Evolving views of telomerase and cancer*, T. Cel. Bio., 13, 6:289-294, **2003**

[25] – Corey DR, Monia BP e Chen Z, *Telomerase Inhibition, Telomere Shortening, and Decreased Cell Proliferation by Cell Permeable 2'-O-Methoxyethyl Oligonucleotides*, J. Med. Chem., 45:5423-5425, **2002**

[26] – Goldman MA, *The role of telomeres and telomerase in Cancer*, DDT, 8, 7:294-296, **2003**

[27] – Hekimi S, Bénard C, *Long-lived mutants, the rate of aging, telomeres and the germline in Caenorhabditis elegans*, Mech Ageing Dev., 123:869-880, **2002**

[28] – Hahn WC, Zhao JJ, Roberts TM, *Functional genetics and experimental models of human cancer*, Tr. Mol. Med., 10, 7:344-350, **2004**

[29] – Tollefsbol TO, et al., *Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection*, Mech. Ageing Dev., 124:989-998, **2003**