

Ana Isabel Varejão Lima de Sousa

*Prof. Ana Isabel
Castro*

SENESCÊNCIA EM BACTÉRIAS

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas
Porto, 2013

10.12.2013

Ana Isabel Varejão Lima de Sousa

SENESCÊNCIA EM BACTÉRIAS

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

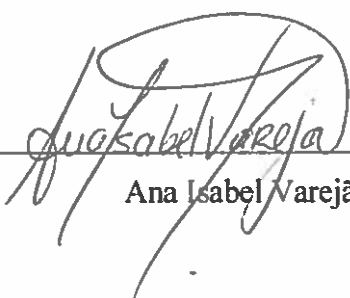
Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2013

Ana Isabel Varejão Lima de Sousa

SENESCÊNCIA EM BACTÉRIAS

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas



Ana Isabel Varejão Lima de Sousa

Sumário

A senescência apresenta-se como um processo metabolicamente ativo, desencadeado por múltiplos fatores, limitando o tempo de vida, uma vez que quando a célula entra em processo de senescência perde irreversivelmente a capacidade de proliferar. As bactérias eram consideradas microrganismos potencialmente imortais devido à sua reprodução assexuada por fissão binária. Contudo, estudos realizados quer com bactérias que sofrem divisão assimétrica (*Caulobacter crescentus*), quer com bactérias onde a divisão é aparentemente simétrica (*Escherichia coli*), demonstram que os seus constituintes celulares não são aleatoriamente distribuídos pelas duas células-filha, havendo uma segregação assimétrica de danos celulares e fatores de envelhecimento. A análise dos mecanismos moleculares subjacentes à degeneração celular bacteriana revela semelhanças interessantes com o processo de envelhecimento de organismos superiores.

Palavras-chave: senescência, divisão celular assimétrica, divisão celular simétrica, procariontes, espécies reativas de oxigênio, senescência replicativa, senescência condicional.

Abstract

Senescence presents itself as a metabolically active process, triggered by multiple factors, limiting the life time, since when the cell enters in senescence, it loses irreversibly the capacity to proliferate. Bacteria were considered potentially immortal organisms due to their asexual reproduction by binary fission. However, studies using either bacteria with asymmetric fission (*Caulobacter crescentus*), either bacteria where the division is apparently symmetric (*Escherichia coli*), showed that their cellular constituents are not randomly distributed between the two daughter cells, and that there is an asymmetric segregation of cell damage and aging factors. The analysis of the molecular mechanisms underlying bacterial cell degeneration reveals interesting similarities with the aging process of higher organisms.

Keywords: senescence, asymmetric cell division, symmetric cell division, prokaryotes, replicative senescence, conditional senescence.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Fernando Pessoa, instituição que me proporcionou a minha formação académica, inculcando-me valores necessários para que eu possa ser uma boa profissional. Obrigada pela oportunidade.

Queria agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Anabela Castro, por todo o apoio, disponibilidade e atenção que sempre demonstrou. Muito obrigada.

Agradeço aos meus pais, que sempre me souberam dar os melhores conselhos e críticas em tudo na vida, amparando-me e ajudando-me a tornar-me numa melhor pessoa todos os dias. Obrigada mãe e pai!

À minha irmã, Joana, não só pela amizade desde sempre mas também pelo orgulho que sempre demonstrou ter em mim, é muito importante para mim.

Quero também agradecer ao Luís Oliveira, pelo incentivo e ajuda ao longo de todos estes anos de curso, sem ele nada disto seria possível. Obrigada!

Ao André Salvador, por toda a paciência e compreensão, pela partilha de alegrias e angústias, obrigada pelo apoio incondicional.

Obrigada à Ângela Borlido, pelo companheirismo e amizade demonstradas ao longo do meu percurso académico. Vou ter saudades destes tempos.

Agradeço também à Isabel Conrado, minha colega de curso e companheira de dissertação, pelo apoio e incentivo que sempre demonstrou.

A toda a minha família e amigos, cada um tem um significado especial. Obrigada por estarem sempre presentes!

O meu mais sincero obrigada, a todos os acima mencionados, pois todos de alguma forma contribuíram para eu crescer não só como profissional mas também como pessoa. Ser-vos-ei eternamente grata por fazerem parte da minha vida!

Índice Geral

Sumário	i
Abstract	ii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
I. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais sobre senescência em eucariontes	3
1.2. A senescência no contexto de evolução e adaptação	4
1.3. Tipos de senescência.....	6
1.3.1. Senescência replicativa	6
1.3.2. Senescência condicional/ prematura.....	7
1.4. Morfologia das células senescentes	7
1.5. Biomarcadores de senescência	7
II. Fatores indutores de senescência em células eucariontes	8
2.1. Senescência em culturas celulares	9
2.2. Senescência dependente dos telômeros.....	10
2.3 Senescência iniciada por danos no DNA	12
2.4. Senescência induzida por oncogenes	14
2.5. Senescência induzida por drogas citotóxicas	15
2.6. Senescência induzida por stress oxidativo	15
III. Modelo unicelular de senescência em eucariontes.....	16
3.1. O ciclo celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.2. A senescência e o ciclo celular	19
3.3. Características fenotípicas associadas ao envelhecimento e senescência	19
3.4. Mecanismos de envelhecimento e senescência em <i>S. cerevisiae</i>	20

3.5.	Mecanismos implicados na senescência em <i>S. cerevisiae</i>	21
3.5.1.	Fatores de senescência citoplasmáticos	21
3.5.2.	Genética do envelhecimento	22
3.5.3.	Stress oxidativo e a teoria dos radicais livres do envelhecimento.....	23
3.5.4.	Danos e reparação do DNA.....	23
3.5.5.	Danos no DNA mitocondrial e envelhecimento.....	24
IV.	Senescência em procariontes	25
4.1.	Senescência numa bactéria com divisão assimétrica: <i>Caulobacter crescentus</i>	26
4.1.1.	O ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i> :.....	26
4.1.2.	Modelo experimental da bactéria <i>C. crescentus</i>	28
4.2.	Causalidade final para assimetria	28
4.3.	Senescência numa bactéria com divisão simétrica: <i>Escherichia coli</i>	29
4.3.1.	Será esta citocinese completamente simétrica?.....	30
4.3.2.	Modelo experimental de <i>E. coli</i>	32
4.3.3.	<i>Trade-off</i> entre reprodução e manutenção.....	34
4.3.3.1.	Redes reguladoras do trade-off entre manutenção e reprodução	34
4.3.3.2.	<i>Trade-off</i> como consequência da competição do fator sigma	37
4.3.3.3.	A restrição calórica e a competição do fator sigma	39
4.3.4.	A importância do controlo de qualidade das proteínas na senescência condicional em <i>E. coli</i>	39
4.3.4.1.	Sistemas de chaperonas em <i>E. coli</i>	41
4.3.5.	Papel das proteínas de stress universais na senescência condicional	43
4.3.6.	Oxidação proteica como sinal de indução de proteção cruzada.....	44
V.	A Senescência pode explicar a persistência microbiana	46
5.1.	Características das células persistentes	47
VI.	Descoberta recente... ..	50
VII.	Conclusão	52

VIII. Bibliografia 54

Índice de Figuras

Figura 1 – Os diversos fatores que podem conduzir à senescência

Figura 2 – Senescência dependente do encurtamento dos telômeros

Figura 3 – Senescência controlada pelas vias p53 e p16-pRb

Figura 4 – Divisão celular da *S. cerevisiae*

Figura 5 – Cicatrizes da superfície celular da levedura

Figura 6 – Ciclo celular da levedura

Figura 7 – *Caulobacter crescentus*

Figura 8 – Progressão ao longo do ciclo celular da *Caulobacter crescentus*

Figura 9 – *Escherichia coli*

Figura 10 - *Escherichia coli*

Figura 11 – Representação esquemática de possíveis fatores de envelhecimento num modelo bacteriano cuja divisão binária tem um comportamento simétrico

Figura 12 – Representação esquemática das divisões celulares em *E. coli*, simétrica no que concerne ao tamanho e massa, contudo origina polos celulares com idades diferentes.

Figura 13 – Modelo para o *trade-off* entre reprodução e sobrevivência

Figura 14 – Papel de chaperonas HSP e protéases na redução da oxidação proteica

Figura 15 – Possíveis locais de envolvimento de oxigénio no desencadeamento da regulação de choque térmico durante a entrada das células na fase estacionária.

Figura 16 – Representação esquemática da transição entre envelhecimento e não-envelhecimento de *S. pombe*.

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Genes e proteínas com suas respectivas funções e vias de indução

Lista de abreviaturas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

C. crescentus – *Caulobacter crescentus*

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

E. coli – *Escherichia coli*

S. pombe – *Schizosaccharomyces pombe*

DDR – Resposta do DNA ao dano

LAP – Quebras na cadeia dupla

DSB's – “Double strand breaks”

TERT – Transcriptase reversa da telomerase

CDK – Cinases dependents de ciclina

pRb – Proteína Retinoblastoma

CKI – Proteína inibidora de cinase dependente de ciclina

DOX - Doxorrubicina

DNR - Daunorrubicina

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

ERC – Circulos de DNAr extra-cromossómico

LAG 1- Longevity-assurance gene 1

LAG2 – Longevity-assurance gene 2

HSPs – Proteínas de choque térmico

PSU – Proteínas de stress universais

ATP – Adenosina trifosfato

SA- β -GAL – Senescence-associated-beta-galactosidase

I. Introdução

O envelhecimento é um processo contínuo de degradação da condição de um ser vivo ao longo do tempo, que se inicia no nascimento e culmina na morte, sendo este processo de envelhecimento partilhado pela generalidade dos organismos (Ackermann, 2008; Teixeira & Guariento, 2010).

O conhecimento acerca de senescência desenvolve-se na direção de uma abordagem integrativa. Este fenómeno constitui um desafio para vários investigadores, surgindo várias teorias no sentido de tentar explicar o processo complexo que é a senescência.

A senescência celular é um fenómeno biológico de ocorrência natural entre os seres vivos, sendo um processo metabolicamente ativo, desencadeado por múltiplos fatores e essencial para o processo de envelhecimento.

A senescência celular foi formalmente descrita há mais de quatro décadas atrás, onde se demonstrou que as células tinham uma capacidade limitada para proliferar, isto é, as células apresentam um potencial de replicação limitado, que é alcançado com uma diminuição gradual da velocidade das divisões celulares, acompanhado de manifestações características das células senescentes, culminando na incapacidade de divisão celular.

Em suma, a senescência apresenta-se como um mecanismo que limita o tempo de vida celular e constitui uma barreira para a imortalização celular, onde a célula perde irreversivelmente a capacidade de proliferação.

Nas células eucariontes, existem múltiplos fatores que caracterizam e desencadeiam a senescência celular estando relacionados com mudanças degenerativas e com os efeitos nocivos da passagem do tempo (Blacombe *et al.*, 2001; Teixeira & Guariento, 2010).

A maioria dos estudos sobre o envelhecimento em eucariontes, tem sido realizado no modelo experimental da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este microrganismo sofre

uma divisão celular assimétrica, o que permite que a célula-mãe seja facilmente distinguível da célula-filha.

Mas será que todos os organismos envelhecem? Ou existirão organismos que perduram para sempre a não ser que sejam mortos por fatores externos? (Ackermann, 2008)

Durante muito tempo, acreditou-se que certas formas de vida não eram afetadas por este processo de envelhecimento, assumindo-se as bactérias como seres potencialmente imortais (Ackermann, 2008).

As bactérias reproduzem-se de forma assexuada por divisão binária ou cissiparidade (divisão múltipla), assim sendo, estas dividem-se aparentemente em duas células iguais. Pelo facto da fissão binária das bactérias ser assumida como uma dispersão não-conservativa dos seus constituintes tanto intactos como danificados (Nystrom, 2007), era comumente assumido que ambas as células nascem igualmente jovens e que estes organismos não demonstram qualquer diminuição da sua condição com o aumento da longevidade (Ackermann, 2008).

Contudo, alguns sistemas unicelulares simples também sofrem divisão assimétrica, permitindo uma completa distinção entre célula-mãe e célula-filha, o que levou alguns investigadores a questionarem se estes microrganismos também estariam sujeitos a um processo de envelhecimento.

Por sua vez, alguns investigadores estudaram a possibilidade de bactérias que se dividem em duas células aparentemente idênticas poderem realizar uma segregação assimétrica de danos celulares e fatores de envelhecimento, permitindo identificar após cada divisão celular a célula-mãe envelhecida da célula-filha rejuvenescida.

A senescência condicional em células bacterianas, surge quando estas entram num estado não proliferativo devido a fatores externos como o esgotamento de nutrientes, levando-as a perder gradualmente a sua capacidade de recuperação e de divisão. Estas células “estéreis” inicialmente permanecem intactas, mas podem eventualmente, perder

a integridade da sua membrana citoplasmática, assim como, outras atividades de apoio à vida.

A análise da senescência condicional em *Esherichia coli* revelou semelhanças interessantes com o processo de envelhecimento dos organismos eucariotas fornecendo mecanismos que sustentem algumas teorias do envelhecimento, incluindo a hipótese da contribuição dos radicais livres no envelhecimento e da teoria do soma descartável.

Uma descoberta recente, veio quebrar o dogma de que todos os organismos vivos envelheciam. Pois após estudos realizados com a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*, descobriram que esta, quando cultivada em condições favoráveis, não demonstra qualquer sinal de passagem pelo complexo processo de envelhecimento.

1.1. Considerações gerais sobre senescência em eucariontes

Os organismos não deviam envelhecer, ou pelo menos, deveria existir um mecanismo que evitasse o processo de envelhecimento. Uma vez que, os organismos apresentam uma notável capacidade de reparar diferentes tipos de danos, não haveria razão para que os danos prejudiciais causados pela simples passagem do tempo não pudessem, também eles, ser reparados (Martins, 2011).

A senescência culmina inevitavelmente na morte do organismo e o tempo que leva para que os indivíduos apresentem sinais de envelhecimento varia consideravelmente entre espécies.

A evolução funciona de forma a que todas as espécies que apresentam senescência, deveriam ser substituídas por outras, onde o envelhecimento não ocorre (ou acontece a um ritmo mais lento). Contudo, envelhecer parece tão natural que não há uma verdadeira percepção da contradição entre senescência e evolução (Goldsmith, 2008).

Existindo uma programação genética para envelhecer, poder-se-ia eventualmente realizar esforços a nível da investigação científica com o objetivo de travar os

mecanismos subjacentes ao envelhecimento, contudo, tal investigação teria como consequência profundas implicações médicas e demográficas. Por conseguinte, esta programação genética não será observada caso não sustente uma vantagem evolutiva para os organismos (Martins, 2011).

1.2. A senescência no contexto de evolução e adaptação

A complexidade etiológica do fenómeno de senescência é um desafio para os investigadores. Para isso, surgiram várias teorias explicativas da biologia do envelhecimento, que discutem mecanismos relevantes deste processo (Teixeira & Guariento, 2010).

As teorias sobre a biologia do envelhecimento têm sido classificadas de várias formas, as que aqui irei abordar são as teorias evolutivas, que procuram explicar a origem do processo de envelhecimento e as diferenças encontradas na longevidade de diferentes espécies (Kirkwood, 2002).

Uma das teorias evolutivas propostas é a pleiotropia antagonista, que propõe a existência de adaptações genéticas que ao fornecer benefícios durante a juventude, se tornam prejudiciais numa fase tardia da vida (Martins, 2011). Ou seja, os genes selecionados para beneficiar os jovens favorecendo a reprodução, estariam posteriormente relacionados com as mudanças características da senescência.

A manutenção desses genes seria vantajosa no sentido de favorecer a reprodução, dado que no seu habitat natural, a esperança média de vida dos organismos não lhe permitia que os efeitos prejudiciais se manifestassem. Por conseguinte, os benefícios poderiam compensar o dano posterior. Durante o ciclo de vida, a maturidade da função reprodutiva representaria um ponto fulcral para o início da senescência: quanto mais cedo ocorre a reprodução, mais cedo se inicia a senescência.

Contrariando esta teoria, estudos laboratoriais com *Drosophila melanogaster*, sugerem não existir uma relação linear entre a velocidade de desenvolvimento e a longevidade,

concluindo que o envelhecimento não é causado por nenhum benefício inicial (Kirkwood, 2002; Gavrilov *et al.*, 2002).

Uma outra teoria evolutiva para a explicação do fenômeno de senescência é designada por mutação acumulada. Esta teoria pressupõe que todos os organismos apresentam sinais de senescência, mostrando danos cada vez maiores quanto maior for o seu tempo de vida (Martins, 2011).

Se a morte dos indivíduos ocorrer antes da expressão de uma mutação, significa que a seleção natural tem poucas oportunidades para “limpar” o genoma. E deste modo, os indivíduos transmitiriam mutações prejudiciais de ação tardia de uma geração para outra, ocorrendo assim uma acumulação de mutações no genoma (Kirkwood, 2002; Gavrilov *et al.*, 2002).

Em ambientes protegidos, a mortalidade por causas secundárias encontrar-se-ia reduzida, sendo que o envelhecimento resultaria da acumulação de mutações de ação tardia (Gavrilov *et al.*, 2002).

Contrariando o que esta teoria prevê, surge a evidência de que as tartarugas fêmeas mostram um aumento da fertilidade com o envelhecimento (Congdon *et al.*, 2003).

A terceira teoria evolutiva do envelhecimento é a teoria do soma descartável, que se baseia na seleção individual. A ideia é que todos os animais necessitam de sistemas de reparação e manutenção, assim como, de energia proveniente dos nutrientes para manter corretamente as suas funções. Sendo fundamental que todos estes sistemas operem durante a maior parte da vida reprodutiva do animal (Martins, 2011).

Como em habitat natural a mortalidade extrínseca é elevada, não seria produtora a utilização de energia para manter o organismo além do seu tempo de vida (Kirkwood, 2002). Assim sendo, a energia deve ser direcionada para melhorar a capacidade reprodutiva do indivíduo, mas não para mantê-lo vivo indefinidamente (Kirkwood, 2002).

Algumas das teorias que já foram descartadas preveem que, uma mutação que aumente o tempo de vida do animal, deve diminuir o seu metabolismo, uma vez que, os recursos teriam que ser desviados de outras funções.

No entanto, foram observadas mutações genéticas que permitem uma vida mais longa e não causam outras perdas (Ayyadevara *et al.*, 2007).

Estudos de genética molecular, têm demonstrado que a longevidade pode estar sujeita a regulação e que intervenções genéticas podem eventualmente reverter o envelhecimento em animais (Ljubuncic *et al.*, 2009).

Atualmente coloca-se a hipótese de que o envelhecimento possa não ser completamente relacionado com a fertilidade, sendo assim possível que os animais vivam por mais tempo, sem custos para a sua fertilidade.

Somos levados a concluir, que a senescência pode realmente ser, por si só, uma adaptação, que pode não ser uma consequência prejudicial de outros ganhos. Se for esse o caso terá que oferecer benefícios (Mitteldorf, 2010; Martins, 2011).

1.3. Tipos de senescência

A senescência celular pode ser dividida em dois tipos, encontrando-se esta classificação intimamente relacionada com o ciclo celular.

1.3.1. Senescência replicativa

A determinado momento, as células perdem o seu potencial replicativo, e esta perda irreversível da capacidade de replicação está diretamente associada ao encurtamento dos telômeros. Este fenómeno deve-se à perda do material genético localizado na região terminal dos cromossomas.

Assim a primeira causa da senescência celular passou estar associada ao progressivo encurtamento dos telômeros. Sem eles, não é possível haver distinção entre o terminal dos cromossomas e o pareamento das bases de cada fita (cadeias da dupla hélice) estando assim sujeitos à degradação ou fusão pela maquinaria de reparação de DNA (Campisi, 2003).

1.3.2. Senescência condicional/ prematura

A senescência pode ser induzida por uma variedade de outras condições na ausência de perda ou disfunção telomérica detetável. Este tipo de senescência foi designada de prematura, uma vez que surge antes da fase em que é induzida pelo encurtamento dos telômeros (Kuilman *et al.*, 2010).

1.4. Morfologia das células senescentes

A senescência celular é geralmente acompanhada por alterações fenotípicas, que dependendo do fator indutor de senescência pode fazer com que as células se possam transformar assumindo um fenótipo grande, planar e multinuclear. Um fenótipo de célula plana é comumente visto em células cuja senescência foi induzida por oncogenes (Denoyelle *et al.*, 2006), senescência induzida por stress (Parrinello *et al.*, 2003), ou senescência induzida por danos no DNA (Chen *et al.*, 2001). As células senescentes que adquirem morfologia fusiforme, são observadas em casos de expressão de BRAF^{E600} (uma mutação no gene BRAF muito comum em melanomas, que resulta da substituição do aminoácido valina por um ácido glutâmico na posição 600). Melanócitos submetidos a senescência induzida por oncogenes, apresentam grande vacuolização como resultado do stress causado pelo retículo endoplasmático em resposta à proteína desdobrada (Denoyelle *et al.*, 2006; Kuilman *et al.*, 2010).

1.5. Biomarcadores de senescência

A senescência pode ser induzida por uma grande variedade de condições, e as células senescentes apresentam uma série de características que permitem a sua identificação. Deste modo, a execução de programas de senescência está associada com o

aparecimento de vários marcadores, que são vulgarmente utilizados, a fim de identificar as células senescentes *in vitro* e *in vivo* (Kuilman *et al.*, 2010).

Eles incluem a perda da proliferação, as alterações morfológicas, o aumento da atividade de SA- β -GAL, entre outros (Kuilman *et al.*, 2010). SA- β -GAL é o biomarcador de senescência mais comumente utilizado (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009). A sua atividade aumentada nas células senescentes provém da β -D-galactosidase lisossomal, a qual é codificada pelo gene *GLB1* (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009). Além disso, as células não senescentes exibem atividade da β -galactosidase em lisossomas, que funcionam de forma otimizada, a pH 4 (Lee *et al.*, 2006). Por conseguinte, o aumento da atividade da SA- β -GAL em células senescentes, é provavelmente devido a uma expansão do compartimento lisossomal, dando origem a um aumento na atividade de β -galactosidase que pode ser também medido a pH 6 (Kurz *et al.*, 2000; Yang e Hu 2005; Lee *et al.*, 2006). No entanto, ainda não há evidências que apontem para um envolvimento desta enzima em resposta à senescência (Lee *et al.*, 2006; Kuilman *et al.*, 2010).

II. Fatores indutores de senescência em células eucariontes

O que faz com que células se tornem senescentes? Estudos *in vitro*, demonstram que a senescência pode ser induzida por diversos estímulos (Figura 1).

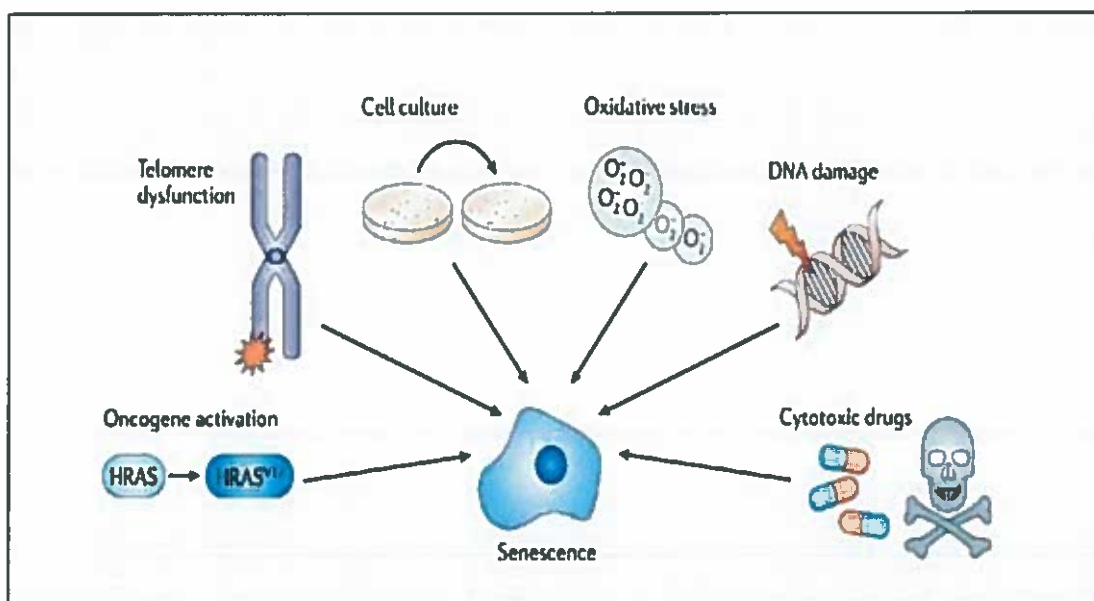


Figura 1: Os diversos fatores que podem conduzir à senescência (retirado de Souza, 2011).

2.1. Senescência em culturas celulares

A senescência celular foi formalmente descrita há mais de quatro décadas atrás, quando Hayflick e seus colegas demonstraram que as células “normais” tinham uma capacidade limitada para proliferar em cultura. Esta experiência demonstrou que os fibroblastos humanos em cultura apresentam um potencial limitado de replicação: aproximadamente cinquenta divisões segundo o limite de Hayflick (Troen, 2003; Kuilman *et al.*, 2010). Esse potencial é alcançado com diminuição progressiva da velocidade das divisões celulares e com manifestações que são características das células senescentes. Essas manifestações incluem as alterações morfológicas previsíveis, e a expressão genética associada à senescência. Assim sendo, Hayflick e seus colaboradores propuseram a hipótese da senescência celular, como sendo um processo que altera a fisiologia, limitando a capacidade de replicação das células normais em cultura (Troen, 2003; Kuilman *et al.*, 2010).

Após a demonstração de que células somáticas não proliferam indefinidamente surgiram duas hipóteses explicativas, sendo ambas especulativas e aparentemente contraditórias.

A primeira hipótese, resultou do facto de que muitas células cancerígenas proliferam indefinidamente *in vitro*. Propondo a senescência celular como um agente anticancerígeno ou um mecanismo supressor tumoral. Neste contexto, a senescência foi considerada benéfica, pois evitaria a formação de tumores. A segunda hipótese, baseou-se na evidência de que o processo de regeneração e reparação tecidual decai com a passagem do tempo. A senescência celular foi proposta para recapitular o envelhecimento, ou perda de capacidade de regeneração de células *in vivo*. Neste contexto, a senescência celular foi considerada prejudicial porque contribuiu para o decréscimo na renovação tecidual (Campisi & Fagagna, 2007).

Existe atualmente uma melhor compreensão da senescência, tendo sido fundidas as duas hipóteses, trazendo novas perspectivas para as áreas relacionadas com cancro e envelhecimento (Campisi & Fagagna, 2007).

2.2. Senescência dependente dos telômeros

A hipótese que aborda a senescência como o resultado do encurtamento dos telômeros sugere que o número de divisões celulares está registado pela perda gradual de sequências teloméricas. Os telômeros estabilizam os cromossomas e asseguram a ocorrência de uma completa replicação, embora se saiba que estes também contribuem para a fixação de cromossomas na matriz nuclear (Holliday, 1996; Powell *et al.*, 2010).

Os telômeros são estruturas constituídas por uma sequência repetida de DNA (5'-TTAGGG-3' nos vertebrados) e proteínas associadas, localizados nas extremidades dos cromossomas, sendo a sua principal função preservar a estabilidade estrutural do cromossoma e a integridade dos genomas, protegendo-o da degradação ou fusão mediante processos de reparação de DNA. Os telômeros estão presentes principalmente em células eucarióticas, visto que o DNA das células procarióticas forma, de um modo geral, cadeias circulares, logo não tem locais de terminação, embora existam exceções tais como, bactérias com DNA linear e que possuem telômeros (Campisi & Fagagna, 2007; Teixeira & Guariento, 2010).

Apesar da estrutura telomérica não ser completamente conhecida, pensa-se que os telômeros de mamífero, terminam numa grande estrutura circular, designada por t-loop. Pelo facto das DNA polimerases padrão não conseguirem replicar completamente as extremidades do DNA, num fenómeno chamado de “problema do final da replicação”. As células perdem entre 50 a 200 pares de bases de DNA telomérico durante cada fase de síntese do ciclo celular (Figura 2) (Griffith, 1999 & Campisi & Fagagna, 2007).

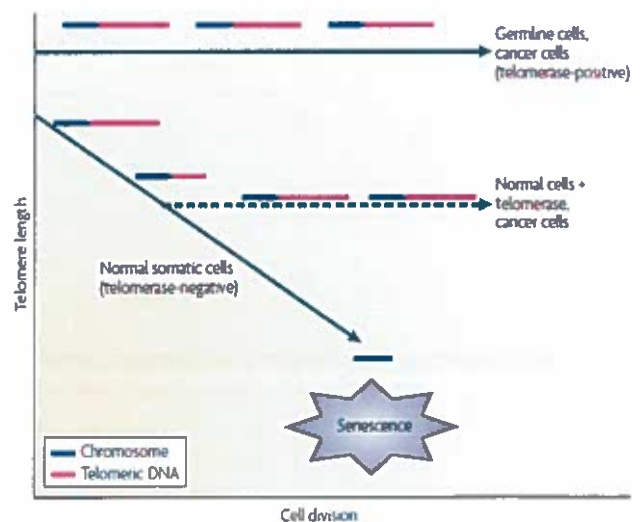


Figura 2: senescência dependente do encurtamento dos telômeros (Campisi & Fagagna, 2007).

No início da replicação, a DNA polimerase atua na direção 5'-3', sendo adicionadas bases com o auxílio de um iniciador. A secção do telômero coberto por DNA

polimerase não é reproduzida, causando assim um encurtamento do DNA de cerca de 50 pares de bases por divisão na extremidade 5' (Powell, 2010).

O comprimento dos telómeros humanos pode variar de algumas quilobase até 10-15 kb de comprimento, sendo possível ocorrerem múltiplas divisões celulares antes do “problema do final da replicação” que torna os telómeros criticamente curtos e disfuncionais. Para desencadear a senescência basta que um ou alguns telómeros atinjam o tamanho crítico (Hemann, 2001; Campisi & Fagagna, 2007).

O “problema do final de replicação” é uma importante causa da não proliferação indefinida das células normais, contudo, não é a única.

Os telómeros disfuncionais desencadeiam uma resposta clássica do DNA ao dano (DDR). O DDR permite que as células detetem o DNA danificado, particularmente quebras da cadeia dupla (LAP), interrompendo a progressão do ciclo celular e, se possível, promovendo a reparação do dano. Embora a gravidade da lesão seja provavelmente um fator importante, pouco se sabe sobre como as células escolhem entre respostas transitórias de ativação da DDR e sinalização persistente de DDR que é evidente em muitas células senescentes. Muitas proteínas participam na DDR, incluindo as cinases, as proteínas adaptadoras e modificadores de cromatina. Muitas destas proteínas localizam focos de DNA danificado que são detetados em células senescentes. Em células que apresentam senescência devido aos telómeros disfuncionais, estes focos também contêm um subconjunto de telómeros, sugerindo uma semelhança entre telómeros disfuncionais e DSBs (double-strand-breacks) (Gire *et al.*, 2004; Herbig *et al.*, 2004; Campisi & Fagagna, 2007).

O “problema do final de replicação” pode ser contornado pela telomerase. Esta enzima contém uma proteína catalítica (transcriptase reversa da telomerase; TERT) e é constituída de uma sequência curta de RNA e adiciona DNA telomérico duplicado diretamente ao final do cromossoma (Campisi & Fagagna, 2007).

A expressão da telomerase ocorre nas células de linhagem germinativa, nas células-tronco e nas células neoplásicas, havendo nestas células uma regeneração dos telômeros e conseqüente prevenção da senescência replicativa.

No entanto, a maioria das células “normais” apresenta pouca ou nenhuma atividade da enzima telomerase, e assim sendo, os telômeros são encurtados durante o crescimento replicativo conduzindo conseqüentemente à senescência celular.

Contudo, a telomerase não pode impedir a senescência causada por danos não-teloméricos do DNA ou outros indutores de senescência (Blackburn, 2000; Teixeira & Guariento, 2010; Campisi & Fagagna, 2007).

2.3 Senescência iniciada por danos no DNA

A senescência celular está diretamente associada a um controle que ocorre durante o ciclo celular garantindo as condições apropriadas para a divisão. Para tal regulação há proteínas com funções controladoras positivas e negativas.

As proteínas reguladoras positivas são as CDK (cinases dependentes de ciclinas), que são ativadas somente em determinadas fases do ciclo celular, possuindo atividade catalítica em que realizam a fosforilação de proteínas específicas, e as ciclinas, que atuam como ativadoras das CDK ao formar um complexo ciclina-CDK.

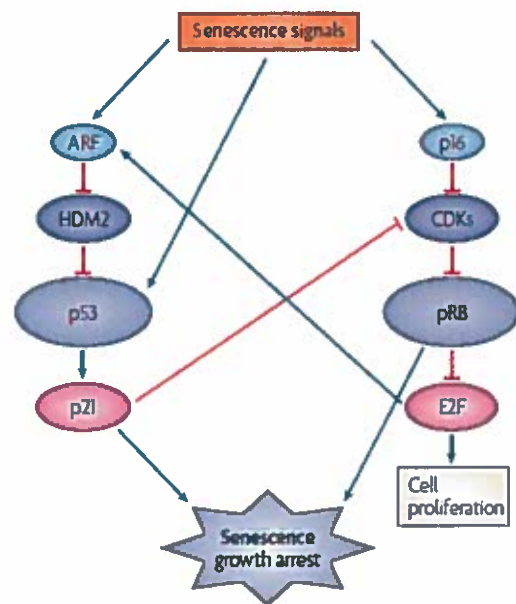


Figura 3: Senescência controlada pelas vias p53 e p16-pRb (Campisi & Fagagna, 2007).

Realizando um controle negativo do ciclo, e por isso envolvidas na senescência celular, estão as proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina, que interagem com o

complexo ciclina-CDK impedindo a sua atividade e as proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb, que atuam impedindo a divisão celular (Figura 3).

A pRb (proteína retinoblastoma), atua como inibidora do ciclo celular, pois quando ativa, liga-se ao fator de transcrição E2F, impossibilitando a transcrição de genes necessários para o prosseguimento do ciclo.

O mecanismo molecular de senescência celular é desencadeado pela transcrição do locus INK4a/ARF, havendo a síntese e a acumulação das proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF} (Andreu *et al.*, 2005).

A p16^{INK4a} atua como uma proteína inibidora de cinase dependente de ciclina (CKI) e a sua acumulação leva à fosforilação de pRb, que se torna ativa e se liga a E2F, impossibilitando a atuação deste na indução da transcrição de genes, conduzindo ao bloqueio do ciclo celular (Alberts *et al.*, 2004).

A outra via de regulação do ciclo celular ocorre através da acumulação da proteína p14^{ARF}, que em condições normais para a ocorrência do ciclo celular encontra-se associada à proteína HDM2, responsável por estimular a degradação de p53 através da ubiquitinação, processo em que a proteína é marcada por moléculas de ubiquitina com o objetivo de ser reconhecida e degradada por proteossomas (Sharpless & Depinho, 2004; Alberts *et al.*, 2004).

Porém, com a acumulação de p14^{ARF} há a ligação desta com HDM2, possibilitando que a proteína p53 fique livre para a atividade fosforiladora de cinases, o que reduz a afinidade de p53 com HDM2, diminuindo a sua degradação (Andreu *et al.*, 2005).

Uma vez fosforilada e em elevada concentração, a p53 torna-se ativa e atua como fator de transcrição de p21, cuja função se relaciona com a inibição das cinases dependentes de ciclina conduzindo conseqüentemente à inativação de pRb (Narita, 2003; Sharpless & Depinho, 2004; Alberts *et al.*, 2004).

É possível que ocorram mutações graves no DNA em qualquer parte do genoma, especialmente danos que provocam a quebra da dupla hélice de DNA (LAP), o que faz com que ocorra senescência em diversos tipos celulares. Seja qual for a natureza dessas mutações, elas podem fornecer sinais constitutivos para que a proteína p53 mantenha as células em paragem de crescimento - senescência.

Ambos os danos, o encurtamento dos telómeros e mutações no DNA, podem desencadear a senescência celular e dependem da proteína p53, sendo geralmente acompanhadas através da expressão de p21 (Campisi & Fagagna, 2007).

No entanto, em muitas células, os danos no DNA e os telómeros disfuncionais também induzem a p16, embora com cinética atrasada. A p16, proporciona em seguida, uma segunda barreira para impedir o crescimento de células com DNA gravemente danificado ou telómeros disfuncionais (Campisi & Fagagna, 2007).

2.4. Senescência induzida por oncogenes

Os oncogenes, têm origem num proto-oncogene, um gene normal que controla a divisão celular, que quando mutado pode dar origem a um oncogene, contribuindo para a progressão do cancro (Nussbaum *et al.*, 2007). As células respondem a muitos oncogenes desenvolvendo mecanismos que as conduzem à senescência. Este fenómeno foi observado pela primeira vez quando, uma forma do oncogene *RAS*, um transdutor citoplasmático de sinais mitogénicos, foi expresso em fibroblastos humanos. Posteriormente, outros membros da via de sinalização de *RAS* assim como as proteínas nucleares pró-proliferativas (por exemplo, a E2F-1), demonstraram provocar senescência quando sobre-expressas ou expressas em oncogenes (Michaloglou *et al.*, 2005; Campisi & Fagagna, 2007).

Porque os oncogenes que induzem a senescência estimulam crescimento celular, a resposta da senescência pode neutralizar a excessiva estimulação mitogénica, colocando deste modo as células, em risco de transformação oncogénica (Campisi & Fagagna, 2007).

2.5. Senescência induzida por drogas citotóxicas

Existem inúmeras drogas quimioterápicas capazes de causar danos graves no DNA. Estas drogas induzem a senescência em células normais.

A quimioterapia clássica tem como foco principal a eliminação das células tumorais, conduzindo-as à morte. A senescência apresenta um papel importante no que diz respeito ao impedimento do desenvolvimento tumoral, uma vez que, as células perdem a capacidade proliferativa.

Estudos demonstram que o tratamento com baixas concentrações com doxorubicina (DOX), estão correlacionadas com a perda de crescimento celular e com alterações na proliferação celular exibindo um perfil semelhante ao do processo de senescência. Em determinados tipos celulares, tais como as células de Jurkat (que correspondem a uma linhagem de linfócitos T humanos), a daunorrubicina DNR induz um perfil de alterações metabólicas semelhante ao da senescência celular (DiMicco *et al.*, 2006; Campisi & Fagagna, 2007).

2.6. Senescência induzida por stress oxidativo

A fisiopatologia subjacente ao envelhecimento é reconhecida como uma consequência de lesão oxidativa (Haines *et al.*, 2013).

Os radicais livres e as espécies reativas ao oxigênio (ROS) foram identificados pela primeira vez em 1954 e são cada vez mais descritos, como fatores envolvidos no fenómeno do envelhecimento biológico (Commenor *et al.*, 1954; Nohl, 1993).

Organismos sujeitos a respiração aeróbia são frequentemente sujeitos a danos lentos mas contínuos dos seus componentes celulares, causados pelo stress induzido pelos radicais livres.

Os radicais livres podem ocorrer naturalmente devido à radiação ou pela utilização de O_2 pelas células aeróbias.

O oxigênio é uma molécula altamente reativa que pode formar ROS, incluindo o anião superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o grupo hidroxilo (OH). Estes radicais livres causam danos em todos os constituintes celulares, particularmente nas proteínas, nos lípidos membranares, assim como mutações do DNA (Powell *et al.*, 2000).

III. Modelo unicelular de senescência em eucariontes



Figura 4: Divisão celular de *S. cerevisiae* (<http://www.dicat.csic.es/dicat/ca/2011/248-la-temperatura-controla-el-mensaje-genetico>)

Muitos dos estudos realizados sobre o envelhecimento microbiano tem utilizado como modelo experimental a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). A divisão celular nesta levedura é assimétrica, com a célula mãe maior e facilmente distinguível da célula filha (Figura 4). Em 1959, Mortimer e Johnson, analisaram inicialmente a vida reprodutiva das células de *S. cerevisiae* individuais. Usando um micromanipulador, removeram fisicamente as filhas recém-enxertadas após cada divisão, registrando a data e o número de cada divisão. Verificaram que em média na célula-mãe ocorreram 24 divisões; sendo que a senescência foi evidente durante as últimas divisões celulares dada a morosidade do processo de replicação que era acompanhado por alterações morfológicas na célula mãe, que incluíam a formação de grânulos refratários e ou a lise celular (Stephens, 2005).

O envelhecimento replicativo na levedura é uma função do número de divisões realizadas por uma única célula, e pode ser quantificada pela enumeração de cicatrizes que apresenta à superfície celular. A célula de uma levedura senescente apresenta uma morfologia e fisiologia distinta das células jovens (Figura 5) (Powell *et al.*, 2000).

A métrica do tempo de vida da *S. cerevisiae* não é cronológica, mas relaciona-se com o número de divisões que uma única célula pode realizar. O número de filhas produzidas por uma célula-mãe, indica a idade relativa da célula, enquanto que o potencial máximo de tempo de vida de uma célula é referido como o limite de Hayflick (Powell *et al.*, 2000).

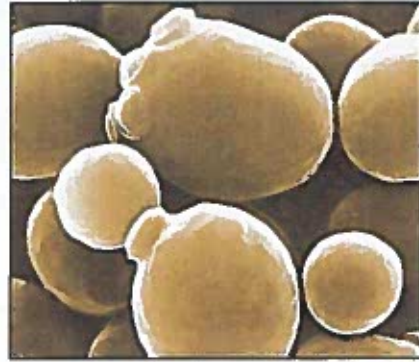


Figura 5: Cicatrizes da superfície celular da levedura (<http://mycor.nancy.inra.fr/blogGenomes/?m=20100501>)

A longevidade da levedura é determinada pelos genes e influenciada por fatores ambientais; contudo, células com o mesmo genótipo apresentam variações intrínsecas da sua longevidade (Powell *et al.*, 2000).

Cada célula de levedura é capaz de se dividir um certo número de vezes antes de alcançar a senescência, na qual, deixa de ocorrer divisão e o metabolismo de morte é iniciado. Esta forma de envelhecimento é conhecida como senescência replicativa e é um fenómeno partilhado tanto por células de levedura como por células de mamíferos.

A senescência é uma consequência da cessação da replicação e está portanto intimamente relacionada com a divisão celular e consequentemente com o ciclo celular (Powell *et al.*, 2000).

3.1. O ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

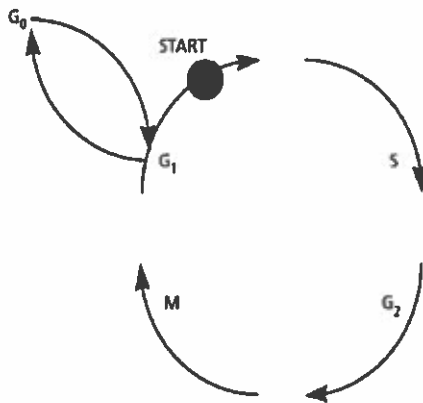


Figura 6: Ciclo celular da levedura
(Powell *et al.*, 2000)

O ciclo celular da levedura (figura 5) envolve a progressão através de uma série de eventos, a replicação incorpora todos os eventos associados à preparação, produção e libertação de células-filha (Walker, 1998).

O ciclo celular pode ser dividido em 5 fases (Figura 6):

G1: que precede a iniciação da replicação do DNA cromossômico e representa a fase de crescimento em que as células devem atingir um tamanho mínimo antes de progredir através do restante ciclo celular. As células de crescimento lento têm um tempo adicional que é gasto na fase G1. Além disso, células filha que nunca produziram descendência são menores do que as suas correspondentes células-mãe e por isso, têm mais fases em G1. Esta diferença é conhecida como assimetria entre a célula-mãe e a célula-filha, onde as células mãe e filha são distinguidas tanto pelo tamanho da célula como pela taxa de divisão (Lew & Reed, 1995).

START: as células que passam em START são forçadas a completar a divisão, ou seja, nesta fase os fatores ambientais como o stress externo ou déficit de nutrientes, não são capazes de impedir a divisão celular. Durante o crescimento exponencial, a proporção de células que progrediram através do Start é mais ou menos igual (50%-50%). A falta de progressão através do START, resulta na paragem da divisão celular e entrada na fase estacionária – G0 (Powell *et al.*, 2000).

G0: é um estado “fora do ciclo” durante o qual não ocorre nenhum aumento no número de células. A entrada em G0 é desencadeada por fatores ambientais adversos, um dos quais o esgotamento de nutrientes (Stewart, 1996).

A fase estacionária, é um fenótipo reversível, pois estabelecendo-se condições ambientais corretas, as células de levedura saem de G0 e reentram no ciclo celular, para iniciar um novo ciclo de divisão celular.

S: assim que proporcionadas todas as condições para que a célula complete START e o restante da fase G1, pode em seguida progredir para a fase S, onde o DNA é replicado e o núcleo migra, separando a célula mãe da célula filha (Powell *et al.*, 2000)

Após mais uma fase de repouso, G2, a célula entra em fase M.

M: é na fase M que ocorre a mitose seguindo-se a divisão celular, emergindo o “filho” a partir de dentro do anel de quitina (Nurse *et al.*, 1998).

3.2. A senescência e o ciclo celular

A senescência é atingida quando a divisão final da célula foi alcançada e é permanentemente retirada para a fase G0.

As células senescentes, param o seu crescimento em G1 e perdem a capacidade de entrar na fase S, provavelmente devido à repressão de genes cruciais reguladores do processo de crescimento. No entanto, tais células podem permanecer viáveis e metabolicamente ativas por um longo período de tempo. Durante as replicações que antecedem este estado, a célula é suscetível de adquirir mutações, que eventualmente, resultam no desenvolvimento do fenótipo do envelhecimento (Powell *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 1998).

3.3. Características fenotípicas associadas ao envelhecimento e senescência

Ao longo do processo de senescência ocorre a diminuição da atividade metabólica acompanhada de múltiplas alterações fisiológicas. Sendo a senescência, caracterizada, por aumento da taxa de mutações e alterações metabólicas conducentes à paragem da divisão celular. Alguns destes aspetos são expressos universalmente, sendo partilhados

por todos os tipos celulares, porém outros podem depender do gênero, espécie ou mesmo estirpe específica (Powell *et al.*, 2000).

Nas leveduras, o envelhecimento resulta de alterações irreversíveis que vão determinar o fenótipo da senescência. Este fenótipo aparece gradualmente ao longo de vida e a ocorrência de certas modificações apresentam-se como biomarcadores na determinação da idade da célula.

Algumas alterações morfológicas associadas ao envelhecimento ocorrem com o objetivo de neutralizar outros aspetos potencialmente prejudiciais para a longevidade, tais como, o processo de enrugamento da superfície celular que é suscetível de compensar a diminuição da área superficial; a acumulação de grânulos refratários contendo lípidos; a variação da expressão genética, sendo que nas drosófilas esta variação é tanto qualitativa como quantitativa, permitindo que as células sintetizem proteínas e enzimas adequadas às diferentes fases da vida útil (Barker & Smart, 1996).

3.4. Mecanismos de envelhecimento e senescência em *S. cerevisiae*

Uma das hipóteses explicativas para o processo de senescência da *S. cerevisiae*, estabelece uma relação entre o impedimento da divisão celular e o volume da superfície célula. À medida que as células envelhecem, elas aumentam o seu tamanho, implicando que uma vez atingido o tamanho crítico, a senescência é iniciada. Demonstrou-se que as variações de volume da célula não afetam a vida útil. Além disso, o controlo do tamanho celular através da administração de ciclinas não influencia o processo envelhecimento. Mortimer & Johnston (1959), sugeriram que a ocorrência de um número crescente de cicatrizes pode limitar a disponibilidade da área de superfície para que ocorra uma nova gemulação e para permitir a troca de nutrientes com o meio ambiente. Estudos revelam que o número de cicatrizes tem pouco efeito na longevidade.

Assim o tamanho da célula e o número de cicatrizes não são de *per se* iniciadores do processo de senescência, mas artefactos relacionados com o envelhecimento (Kennedy *et al.*, 1994).

Outra hipótese para o envelhecimento celular, é de que a capacidade de divisão celular é limitada pelo comprimento dos telômeros. Sendo este fenômeno identificado em múltiplos organismos e pode ser considerado como um relógio biológico que determina o número de divisões anteriores ao desenvolvimento do processo de senescência (Chiu & Harley, 1997).

No entanto, na *S. cerevisiae*, as estirpes exibindo telômeros de vários comprimentos mostram longevidades semelhantes, tendo sido sugerido que o encurtamento dos telômeros pode não ocorrer nas células de levedura (Powell *et al.*, 2000).

3.5. Mecanismos implicados na senescência em *S. cerevisiae*

Contudo, outros mecanismos têm sido implicados na progressão do envelhecimento e senescência, tais como: fatores senescentes citoplasmáticos; senescência e genes específicos da juventude; danos e reparação do DNA, danos oxidativos, e integridade mitocondrial (Powell *et al.*, 2000).

3.5.1. Fatores de senescência citoplasmáticos

Um fator envolvido no processo de envelhecimento descrito como potencialmente causador, é a presença de um fator citoplasmático difusível ou fator de senescência, que se acumula nas mães e é transmissível às filhas (Egilmez & Jazwinski, 1989).

Dentro da célula filha, este agente é diluído, degradado ou inativado para permitir que a célula apresente um ciclo de vida completo.

Contudo, na célula mãe, o agente é retido e acumulado em cada divisão, desencadeando a senescência (Egilmez & Jazwinski, 1989; Kennedy *et al.*, 1994).

Embora a identidade e função deste fator permaneça desconhecida, foi sugerido que o fator de senescência possa estar sob controle genético.

Um dos candidatos para este fator de senescência citoplasmático são os círculos de DNAr extra cromossômico (ERC). O DNAr da levedura, localizado no cromossoma XII dá origem a formas circulares de repetições de DNAr único conhecido como “pop outs” ou ERC’s (Sinclair *et al.*, 1998).

Observou-se que os ERC’s se acumulam nas células-mãe e que induzem prematuramente o fenótipo de senescência se inseridos nas células filha (Sinclair & Guarente, 1997).

3.5.2. Genética do envelhecimento

Postulou-se que o envelhecimento ocorre tanto por inibição de proteínas e enzimas essenciais para o processo metabólico, tais como, enzimas de reparação de DNA ou antioxidantes, ou, alternativamente, através da ativação do gene que causa a produção de proteínas que inibem diretamente a síntese de DNA (Powell *et al.*, 2000).

Alguns genes que influenciam a longevidade da levedura foram identificados. Os genes *LAG1* (longevity-assurance gene 1) e *LAG2* (longevity-assurance gene 2), são expressos preferencialmente em células jovens, indicando que os produtos das proteínas exercem um efeito nesta fase de vida. As funções específicas destes genes não são ainda conhecidas.

A inativação do gene *LAG2* induz uma redução drástica no tempo de semi-vida da *S. cerevisiae*, enquanto que, a sua sobre expressão provoca um aumento significativo da longevidade (Childress *et al.*, 1996; Jazwinski, 1995).

Os genes *RAS* podem alterar a longevidade, pois fazem parte das vias de transdução de sinal envolvidas na deteção do estado nutricional e na resposta ao stress.

A sobre expressão de *RAS1*, não induz um aumento da longevidade. Contudo, a deleção do gene *RAS1* e a sobre expressão de *RAS2*, demonstra aumentar a esperança de vida em 30% (Sun *et al.*, 1994).

3.5.3. Stress oxidativo e a teoria dos radicais livres do envelhecimento

As leveduras sendo seres unicelulares sujeitas a respiração aeróbia, tal como explicado no ponto 2.6, estão igualmente sujeitos a danos lentos mas contínuos dos seus componentes celulares, causados pelo stress dos radicais livres.

3.5.4. Danos e reparação do DNA

O silenciamento, a reparação do DNA e a estabilidade do genoma, são mecanismos importantes na determinação da expectativa de vida.

A análise genética de indivíduos que exibem um aumento do tempo de vida durante o stress induzido por privação de nutrientes, conduziu à identificação de 4 genes, genes esses, que estão envolvidos na reparação e integridade do DNA, estando consequentemente implicados no mecanismo de envelhecimento e senescência das leveduras. O gene *SIR4* pertence à família dos genes *SIR* e apresenta várias funções, tais como, o silenciamento cromático e a repressão de genes situados próximo de telómeros (efeito da posição do telómero). Este gene, é importante na regulação do tempo médio de vida e pode desencadear a senescência silenciando um gene de resposta ao stress, denominado, *AGE*. As proteínas *SIR*, estão envolvidas na reparação do DNA e na proteção do nucléolo (Kennedy *et al.* 1995 ; Osiewacz, 1997; Sinclair *et al.*, 1998).

Outros genes implicados na reparação e integridade do DNA encontram-se envolvidos nos mecanismos de envelhecimento e senescência da *S.cerevisiae*. O gene *SGS1* (slow-growth-suppressor) para além de ser um gene que codifica uma helicase de DNA da levedura, é também um gene que assegura a longevidade e cuja eliminação reduz o tempo de vida da *S.cerevisiae* (Sinclair & Guarente, 1997).

RAD9 é também um gene envolvido na regulação do “checkpoint” do ciclo celular, sendo que a sua deleção tem um efeito marcante na redução da longevidade (Kennedy *et al.*, 1994).

3.5.5. Danos no DNA mitocondrial e envelhecimento

As mitocôndrias são organelos que são simultaneamente fonte e alvo dos ROS, devido à sua proximidade com os radicais livres produzidos pelo metabolismo (Wei *et al.*, 1998).

Apesar do DNA mitocondrial (mDNA) estar exposto aos mesmos agentes mutagênicos que o DNA nuclear, o DNA mitocondrial é muito menos estável do que o DNA nuclear porque contrariamente a este não apresenta proteínas de estabilização (histonas). Assim sendo, o mDNA vai sofrer danos irreparáveis ao longo do tempo, conduzindo a uma disfunção mitocondrial e ao conseqüente envelhecimento (Powell *et al.*, 2000).

Deste modo, tem sido enfatizada a hipótese de que as mitocôndrias apresentam um papel ativo no processo de envelhecimento (Powell *et al.*, 2000).

As proteínas transmembranares mitocondriais codificadas pelos genes *BAP37* e *PHB1*, são necessárias para garantir a longevidade. O DNA mitocondrial é necessário e fundamental para a resistência das leveduras ao stress oxidativo (Coates *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1997).

Dado que a mitocôndria é uma das fontes principais de ROS, tem sido sugerido que uma disfunção mitocondrial pode conduzir à diminuição dos níveis de stress (Longo *et al.*, 1996, Guidot *et al.*, 1993) e, por conseguinte, a uma maior longevidade. Alternativamente, a exigência energética de captadores de radicais livres implica que o tempo de vida seria alargado na presença de mitocôndrias funcionais (Grant *et al.*, 1997).

IV. Senescência em procariontes

As bactérias foram as primeiras e únicos organismos na Terra durante aproximadamente dois bilhões de anos (Ackermann, 2008). Durante muito tempo, descreveram-se estes microrganismos unicelulares como seres que não eram afetados pelo processo de envelhecimento, sendo a sua morte causada apenas por fatores externos. Se assim fosse, significaria que por um longo período de tempo, todos os organismos eram potencialmente imortais e que esta imortalidade apenas se teria perdido em detrimento de formas de vida mais complexas (Ackermann, 2008).

Esta ideia era baseada no facto das bactérias se reproduzirem assexuadamente por fissão binária, não conservando os seus constituintes tanto intactos como danificados. Ou seja, era assumido, que após cada divisão celular, ambas as células seriam igualmente jovens e portanto, nunca chegariam a passar por um processo de envelhecimento.

Contudo, alguns autores expressam diferentes opiniões. Partridge e Barton, consideraram que alguns sistemas unicelulares simples, por sofrerem divisão assimétrica, permitindo uma completa distinção entre a célula-mãe e a célula-filha, estariam sujeitas a um processo de envelhecimento subjacente (Nystrom, 2007).

Tom Kirkwood, por sua vez, argumentou que, em termos teóricos, para sistemas unicelulares simples que se dividem por fissão binária, a segregação de danos irreparáveis poderia ser realizada apenas por uma das células conduzindo à deterioração da mesma. Isto confere uma vantagem seletiva, pois deste modo, a outra célula, completamente rejuvenescida e sem componentes danificados, teria uma capacidade reprodutiva máxima (Nystrom, 2007).

Havendo a percepção que, no que diz respeito aos microrganismos, a medida crítica de envelhecimento poderá estar relacionada com a redução na capacidade reprodutiva, havendo um aumento dos intervalos entre gerações, resultando numa redução do número de descendentes.

4.1. Senescência numa bactéria com divisão assimétrica: *Caulobacter crescentus*

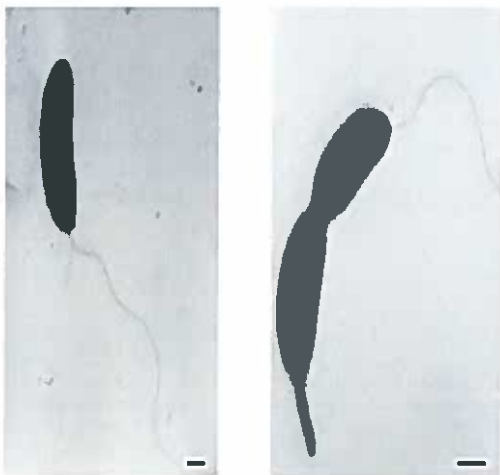


Figura 7: *Caulobacter crescentus* (retirado de Skerker & Laub, 2004).

A bactéria *Caulobacter crescentus* (*C. crescentus*), é um microrganismo aquático de Gram-negativo, não patogénico, (Skerker & Laub, 2004; Manga *et al.*, 1999) que apresenta uma característica incomum entre os procariotas, que consiste na sua divisão assimétrica (Figura 7). Apesar de não ser a única bactéria a fazê-lo, esta diferença evidente entre a célula-mãe e a célula-filha fez com que esta bactéria fosse muito estudada como um modelo para o desenvolvimento celular (Stephens, 2005). Tendo sido relatada como, a

primeira bactéria que apresentava envelhecimento replicativo (Nystrom, 2007).

4.1.1. O ciclo celular de *Caulobacter crescentus*:

A progressão através do ciclo de vida *Caulobacter crescentus* requer a coordenação precisa de alterações morfológicas, metabólicas e eventos do ciclo celular (Figura 8).

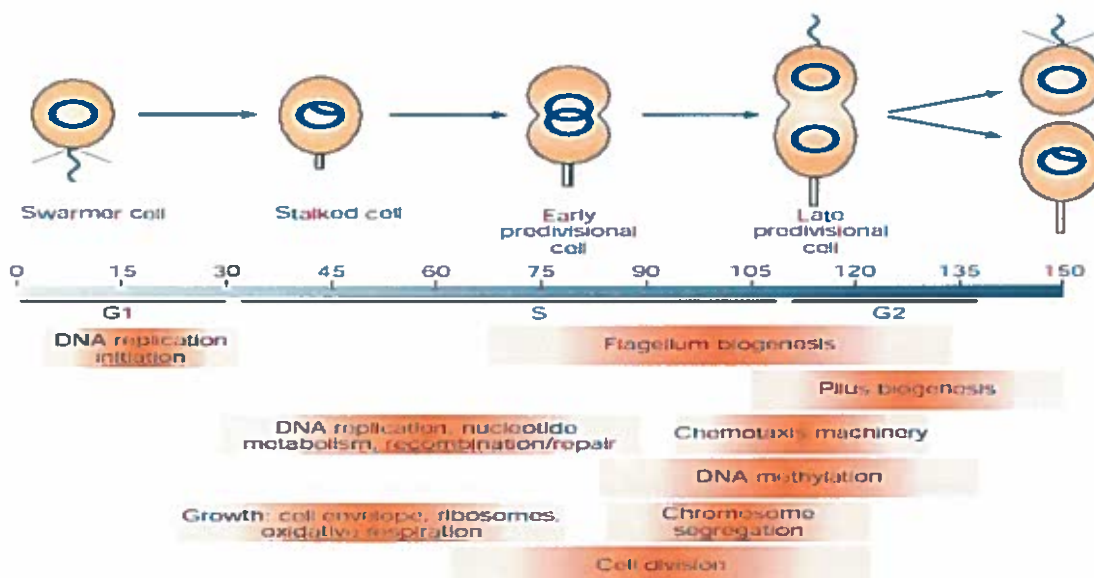


Figura 8: Progressão ao longo do ciclo celular da *Caulobacter crescentus* (retirado de Skerker & Laub, 2004).

O ciclo de vida começa com uma célula móvel, quimiotática designada de célula ‘swarmer’ . Este tipo de célula possui um único flagelo polar, que é usado para lhe conferir motilidade e por um pili polar do tipo IV que medeiam a adesão a superfícies sólidas tanto bióticas como abióticas. A célula ‘swarmer’ não pode iniciar a replicação do DNA, permanecendo em fase G1 com um único cromossoma. Em resposta a determinados sinais, a célula ‘swarmer’ diferencia-se numa célula ‘stalked’. Durante esta diferenciação, o flagelo polar é libertado e os pili polares encontram-se retraídos. No local onde se encontrava o flagelo, é produzida uma haste, que é uma fina extensão tubular da membrana da bactéria. Em simultâneo com esta transição morfológica, a célula entra na Fase S iniciando assim a replicação de DNA (Skerker & Laub, 2004; Stephens, 2005).

A replicação do DNA e a segregação dos cromossomas da célula filha em extremidades opostas da célula em crescimento, ocorre durante a fase S e numa fase breve mas distinta, designada de fase G2. Anteriormente à ocorrência da citocinese, a célula em crescimento localizada no lado oposto à célula ‘stalked’ emite um novo flagelo e começa a formar um novo pili. Assim que o flagelo esteja concluído, a divisão celular prossegue, produzindo duas células-filha que são fisiológica e morfológicamente diferentes. Uma das células é uma célula ‘stalked’ que reinicia imediatamente o ciclo celular, entrando em fase S, a outra célula-filha é uma célula ‘swarmer’, cujo flagelo lhe confere motilidade, abandonando então a célula ‘stalked’ à procura de nutrientes. Posteriormente, esta célula vai acabar por perder o seu flagelo, crescendo a sua própria haste, sendo-lhe permitido aderir a uma nova superfície e continuar o ciclo celular. Por outras palavras, a célula ‘swarmer’ não pode iniciar a replicação do DNA antes de ocorrer a diferenciação celular desta em célula ‘stalked’ (Skerker & Laub, 2004; Stephens, 2005).

Pelo facto da célula ‘stalked’ se encontrar naturalmente imobilizada, e a ‘swarmer’ apresentar mobilidade, a bactéria *C. crescentus* oferece um modelo ideal para a observação do fenómeno de senescência (Stephens, 2005).

4.1.2. Modelo experimental da bactéria *C. crescentus*

Ackermann *et al.* realizaram uma experiência onde estudaram bactérias individualmente através longo período de tempo e sob condições de crescimento ideais. Para isso conceberam uma câmara de fluxo simples, sobre a superfície de uma lâmina de microscópio. Estes investigadores, inocularam células ‘swarmer’ jovens para o canal e aguardaram que estas se diferenciasssem em células ‘stalked’. Durante a diferenciação, as células ligaram-se às paredes da câmara, assim como, à superfície do vidro, onde foram nutridas e oxigenadas por um fluxo de meio com nutriente. As células foram fotografadas em intervalos de 10 minutos durante vários dias. Os intervalos de tempo entre as divisões das células foram calculados e analisados em função da idade da bactéria (Ackermann, 2008; Stephens, 2005).

Ao longo de aproximadamente 100 gerações, Ackermann, *et al.*, observaram que o tempo médio de divisão duplicou, passando de 2,6 horas, até alcançar valores superiores a 5 horas por divisão. Para controlar possíveis efeitos nocivos causados por um longo período de observação, os investigadores estudaram o processo de diferenciação de células ‘swarmer’ em células ‘stalked’ e observaram que apesar das células ‘stalked’ cujo ciclo reprodutivo já se encontrava em declínio deram origem a novas células ‘stalked’ que apresentaram um tempo medio de divisão idêntico ao das células-mãe no início da experiência. Sendo que a passagem pela fase ‘swarmer’, aparentemente rejuvenesce estas células (Ackermann *et al.*, 2003; Stephens, 2005).

4.2. Causalidade final para assimetria

Existirá uma vantagem em produzir células-filha com potencial reprodutivo desigual ou a assimetria será provocada por constrangimentos acidentais, físicos ou metabólicos, que não têm nenhuma influência óbvia sobre a aptidão? Na tentativa de elucidar os prós e contras da divisão simétrica e assimétrica bacteriana, Watve *et al.* (2006) modelaram o crescimento e a propagação dos componentes limitantes do crescimento de um sistema. O modelo aponta para que a divisão assimétrica favoreça o crescimento rápido, enquanto que os resultados de simetria favorecem um crescimento lento, mas mais eficiente, com um rendimento de crescimento mais elevado. Utilizando o mesmo tipo de

abordagem, Ackermann *et al.* (2007) descobriram que uma diferenciação entre uma célula parental envelhecida e uma célula rejuvenescida da sua progenia, rapidamente evolui para lidar com os danos autoinfligidos. Além disso, a segregação assimétrica de danos que não possam ser reparados pode ser benéfica em densidades celulares elevadas e taxas de replicação lentas. Também, mediante pressões externas transitórias que atingem níveis letais, uma segregação assimétrica de danos irreparáveis pode permitir a sobrevivência do clone em detrimento das células de “tipo matriz”, nas quais o dano é retido. Assim, diferentes tipos de modelos e simulações sugerem que a assimetria específica entre células provenientes da mesma célula-mãe pode fornecer ao sistema uma vantagem física (Watve *et al.*, 2006; Ackermann *et al.*, 2007; Fredriksson & Nystrom, 2006; Nystrom, 2007).

No entanto, o esclarecimento acerca da natureza dos componentes críticos (fatores de envelhecimento), será fundamental para estimar os custos energéticos para a segregação de danos contra os custos da remoção de danos (assumindo os danos como sendo pelo menos em parte responsáveis pelo envelhecimento bacteriano) (Nystrom, 2007).

4.3. Senescência numa bactéria com divisão simétrica: *Escherichia coli*

A levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *C. crescentus* apresentam uma divisão que é abertamente assimétrica. A pergunta que se coloca é se esta assimetria seria realmente necessária para o envelhecimento e senescência ocorrerem, como alguns investigadores têm argumentado (Stephens, 2005).



Figura 9: *Escherichia coli*
(<http://4.bp.blogspot.com/-PAQ6Wdb85Mw/TerL535ti3I/AAAAAASCE/p-ewKISsoI/s1600/e-coli.jpg>).

A bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) é uma bactéria de Gram-negativo, pertencente à família das Enterobacteriaceae. Estas bactérias podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, e assumem a forma de bacilo. Possuem múltiplas fimbrias ou pili, dispostos à volta de toda a célula, que são importantes para a sua aderência à superfície das mucosas do hospedeiro, assim como para a sua mobilidade (Figura 9) (Strohl *et al.*, 2004).

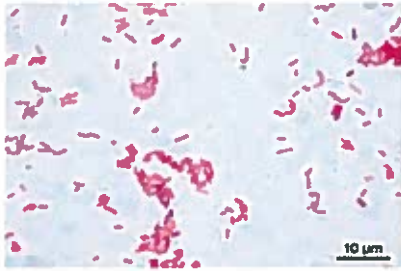


Figura 10: *Escherichia coli*
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Escherichia_coli_Gram.jpg).

As bactérias *E.coli* fazem parte da flora normal do cólon dos seres humanos e de outros animais de sangue quente, contudo, a sua patogenicidade pode apresentar-se tanto dentro como fora do trato gastrointestinal. As bactérias *E.coli* são consideradas como umas das principais causadoras de patologias tais como gastroenterites, infeções do trato urinário, peritonites e septicemias (Strohl *et al.*, 2004).

A *E.coli* é atualmente uma bactéria amplamente utilizada nos campos da ciência e indústria (Figura 10).

4.3.1. Será esta citocinese completamente simétrica?

Eric Stewart *et al.*, (2005), publicaram um estudo no qual observaram o envelhecimento em bactérias, usando como modelo a bactéria *Escherichia coli* (Stewart *et al.*, 2005; Stephens, 2005). O ponto fulcral deste estudo incide no facto de que bactérias desta espécie não mostram uma diferença visível entre mãe e filha, dividindo-se em duas células aparentemente idênticas.

No entanto, uma análise mais aprofundada revelou que esta identidade é apenas superficial, pois até mesmo uma divisão superficialmente simétrica produz dois polos celulares distintos. Esta bactéria em forma de bastonete tem duas extremidades (polos), e estes dois polos que se dividem encontram-se em idades diferentes (Figura 11) (Ackermann, 2008).

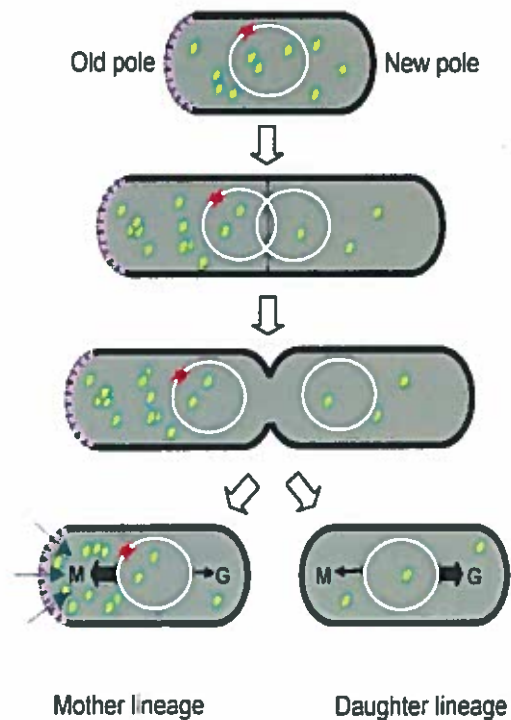


Figura 11: Representação esquemática de possíveis fatores de envelhecimento num modelo bacteriano cuja divisão binária tem um comportamento simétrico (Nystrom, 2007).

Consequentemente, uma das duas células que emergem da citocinese tem um polo mais 'velho', contendo proteínas, parede celular, e estruturas subcelulares antigas, isto é, este polo vai segregar a cadeia de DNA parental, herdando predominantemente as moléculas de DNA citotóxico, assim como as moléculas de DNA danificado ou até mesmo algumas moléculas degradadas e potencialmente citotóxicas, tais como agregados de proteínas no citoplasma (Ackermann, 2008; Pennington, 2007).

A outra célula tem um polo mais 'jovem', que consiste em estruturas biológicas que foram sintetizadas de novo durante o processo de divisão. Como resultado, a célula com o polo velho pode ser considerada uma célula-mãe e a outra, uma célula-filha (Ackermann, 2008).

Por sua vez, quando estes descendentes se dividem, duas bactérias pertencentes à segunda geração herdam um polo que é agora duas gerações mais velho, juntamente com um novo polo. As outras duas bactérias de segunda geração têm um polo velho, juntamente com os seus novos polos (Figura 12) (Stephens, 2005).

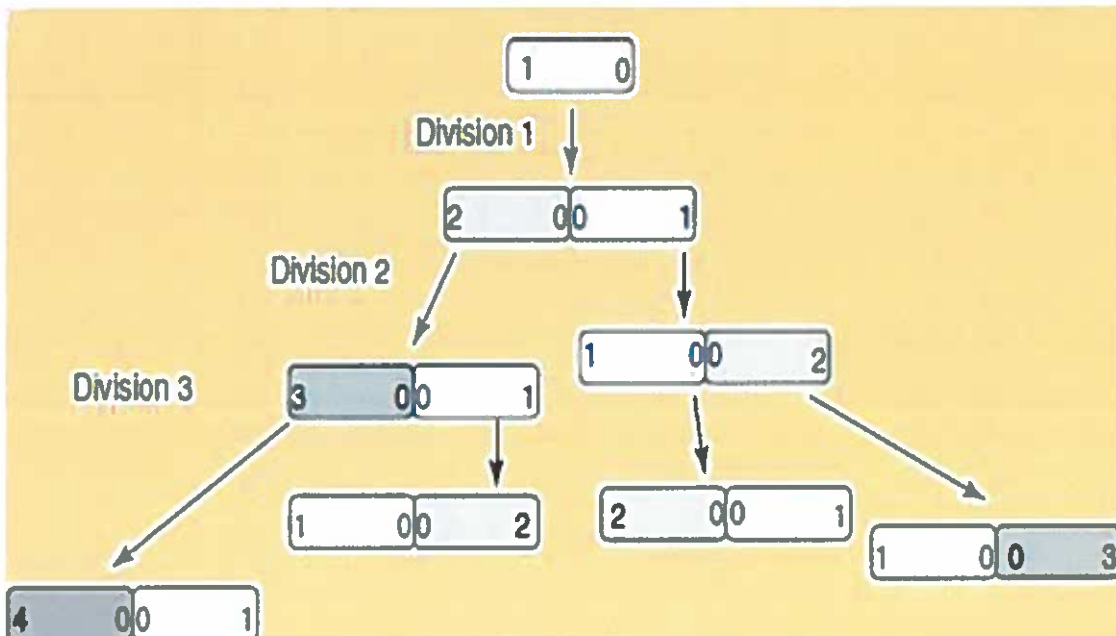


Figura 12: Representação esquemática das divisões celulares em *E. coli*, simétrica no que concerne ao tamanho e massa, contudo origina polos celulares com idades diferentes (Stephens, 2005).

As bactérias *E. coli* com o polo ‘velho’ apresentam um aumento progressivo no seu tempo de geração. As razões apontadas para este declínio na aptidão fisiológica podem estar relacionadas a uma variedade de condicionantes, tais como: o facto de terem herdado material da membrana celular antigo pode reduzir a sua capacidade de defesa contra o meio ambiente; também a segregação de moléculas citotóxicas pode resultar na deterioração da célula com o polo ‘velho’ (Nystrom, 2007).

A consequência desta separação de danos, para além de causar uma redução na aptidão, também se prende com o facto da célula com o polo ‘velho’, ao herdar componentes danificados, mesmo na ausência de citotoxicidade, vai promover o deslocamento das atividades relacionadas com o crescimento e divisão celular, dando prioridade aos sistemas que regulam a manutenção (Nystrom, 2007).

Curiosamente, aquando a observação direta destas células por microscopia foi observado que as células-mãe eram tais como as observadas nas experiências com *C. crescentus*. Uma vez que as bactérias *E. coli* categorizadas como célula-mãe atingem uma idade de oito a dez divisões, diminuem a sua taxa de crescimento em cerca de 3%. Tal indica que o envelhecimento pode ser um fenómeno geral em bactérias, e não restrito a bactérias com uma diferença morfológica óbvia entre célula-mãe e célula-filha (Ackermann, 2008).

4.3.2. Modelo experimental de *E. coli*

A suspeita de que até a divisão superficialmente simétrica produz dois polos celulares distintos (um polo “velho” com componentes que já se encontravam presentes na célula-mãe e um polo “novo” que é formado durante a divisão celular) conduziu à realização de vários estudos (Stephens, 2005).

Stewart *et al.* cultivaram células de *E. coli* em microcolónias de agarose sobre uma superfície, tornando-as relativamente imóveis. Sob estas condições as células adquirem orientações definidas, e foram observadas durante nove gerações (Stewart, *et al.*, 2005). Os intervalos de tempo entre cada geração foram calculados e correlacionados com a idade dos polos da célula (Stewart, *et al.*, 2005).

O custo do processo de envelhecimento em *E.coli* sob estas condições conduziu à conclusão de que o envelhecimento dos polos celulares tem consequências deletérias significativas. As células que herdaram o polo de duas gerações anteriores crescem cerca de 2% mais lentamente do que as células que herdaram o polo apenas da geração anterior, sendo os efeitos do envelhecimento polar aditivos a cada geração (Stephens, 2005).

Durante o tempo decorrido nesta experiência (6 horas), o grupo de células com o polo “velho” produz menos cerca de 3% de biomassa de descendência do que os seus “irmãos” que herdaram os polos mais recentes. Reparou-se ainda que as bactérias que herdaram os polos mais antigos demonstram ser as mais propensas a parar completamente o seu crescimento, contudo este estudo não atentou determinar se as células em paragem de crescimento estavam mortas (Stephens, 2005).

Estes investigadores observaram ainda que em competição, estas células seriam rapidamente substituídas por concorrentes que não envelhecessem, mas apenas se o custo de reparação ou substituição de componentes danificados para evitar a senescência não fosse igual ou superior (Stewart, *et al.*, 2005).

Dependendo do preço a pagar para evoluir e operar sistemas de reparação “perfeitos”, uma solução mais eficaz poderia ser a partição de materiais danificados para apenas uma das células descendentes. Esta possibilidade é apoiada e fundamentada através da observação de que as proteínas danificadas por oxidação são seletivamente retidas nas células mãe de *S. cerevisiae* após a divisão (Aguilaniu *et al.*, 2003).

Usando tal estratégia de particionamento, algumas células acumulam componentes irreparavelmente danificados, comprometendo o seu potencial reprodutivo, a fim de criar um descendente rejuvenescido com capacidade reprodutiva máxima (Stephens, 2005).

4.3.3. *Trade-off* entre reprodução e manutenção

Existem resultados que demonstram que existe uma relação de compromisso (um *trade-off*) entre a reprodução e manutenção em *E. coli*, sendo discutidas no âmbito da teoria de envelhecimento. A explicação molecular para este *trade-off* inclui a competição do fator sigma pela ligação à RNA polimerase, explicando-se que a qualidade do ambiente pode ser percebida e traduzida em sinais intracelulares que controlam a alocação de recursos entre as atividades de manutenção e reprodução. Além disso, os dados apontam para uma ligação entre a precisão de translação e oxidação de proteínas em bactérias *E. coli* senescentes destacando que pode haver ensinamentos a aprender a partir deste sistema modelo também no âmbito da biologia dos radicais livres e do envelhecimento.

Durante a paragem de crescimento, as bactérias são altamente resistentes a uma variedade de tensões secundárias externas tais como calor, oxidantes e pressão osmótica. Esta resistência deve-se a um fenómeno conhecido como “proteção cruzada” induzida na fase estacionária. Esta proteção cruzada deve-se à indução de genes durante a fase estacionária, genes esses que codificam proteínas com funções específicas na proteção da célula contra tensões externas (Nystrom, 2002).

4.3.3.1. Redes reguladoras do *trade-off* entre manutenção e reprodução

Existem duas grandes redes reguladoras responsáveis pela proteção de danos durante o estado não proliferativo em *E. coli*, mais especificamente a proteção cruzada, que depende em grande medida dos fatores de transcrição σ^S (codificado por rpoS) e σ^{32} (codificado por rpoH) (Fredriksson & Nystrom, 2006).

O fator de transcrição σ^S é essencial aquando a defesa de efeitos do stress. Este fator de transcrição, aquando em condições de falta de nutrientes e aumento de stress celular, é acumulado e dirige-se e liga-se à RNA polimerase. O factor de transcrição σ^S demonstrou reduzir a carbonilação de proteínas induzidas pela privação de nutrientes, uma modificação irreversível, que é amplamente utilizada para a deteção de danos oxidativos de proteínas numa variedade de organismos (Nystrom, 2002; Fredriksson & Nystrom, 2006).

O fator σ^{32} é comumente designado como regulão de choque térmico. Além disso, as proteínas de choque térmico (HSPs) σ^{32} , prolongam a vida útil dos organismos superiores quando superproduzidos ectopicamente, e tais efeitos sobre a senescência podem estar relacionados com um possível papel de HSPs na luta contra a oxidação de proteínas. De facto, a superprodução do fator de transcrição de HSP σ^{32} , demonstrou reduzir a carbonilação de proteínas em células de *E. coli* que entram na fase estacionária (Fredriksson, *et al.*, 2005).

Se um destes dois fatores σ for eliminado, as células morrem mais rapidamente na fase estacionária, acelerando assim a senescência (Nystrom, 2002; Fredriksson & Nystrom, 2006).

Os membros do regulão σ^S são um conjunto diverso de proteínas cujas funções se sobrepõem com as dos genes reguladores *daf-16* da *Caenorhabditis elegans*.

O fator de transcrição DAF-16 fork-head é um regulador chave na formação Dauer induzida pela falta de nutrientes. Como tal este regulador, tal como σ^S , orienta o aparelho de transcrição de genes envolvidos na proteção contra choque térmico e agentes oxidantes (Larsen, 1993; Yasuda, *et al.*, 1999; Nystrom, 2002).

A sobre expressão de DAF-16 estende o tempo de vida dos nematodes adultos, enquanto que a sua inativação acelera o envelhecimento e provoca um aumento do dano oxidativo de proteínas (Yasuda, *et al.*, 1999).

Do mesmo modo, os mutantes *E. coli* carecendo de σ^S , exibem senescência acelerada assim como níveis elevados de danos oxidativos nas proteínas durante a fase estacionária (Hengge-Aronis, 2000; Nystrom, 2002).

Em *E. coli*, para além de σ^S , demonstrou-se serem também necessárias proteínas de defesa primárias, tais como: superóxido dismutase, catalases, glutaredoxina 2. Todas elas tratam-se de enzimas antioxidantes necessárias no combate contra a oxidação de proteínas, especialmente na fase estacionária (Vlami-Gardikas, 2002).

No caso de *Salmonella*, tanto σ^S e σ^E demonstraram ser necessárias para a proteção contra danos oxidativos em fase estacionária.

Mutantes com falta de σ^E reduziram a sobrevivência durante a fase estacionária, e aumentaram a suscetibilidade ao stress oxidativo (Testerman, *et al.*, 2002).

As células de uma estirpe de *Salmonella* com falta tanto de σ^E como σ^S , tornaram-se não - viáveis após 24 horas em fase estacionária, mas a sobrevivência destes mutantes é completamente preservada sob condições anaeróbicas em fase estacionária (Testerman, *et al.*, 2002).

Isto reforça o argumento de que os danos oxidativos são um dos principais mecanismos de redução da viabilidade microbiana durante períodos de privação de nutrientes.

Surpreendentemente, demonstrou-se que as mutações no gene que codifica as σ^S são comuns em muitas populações de *E. coli* naturais e de laboratório. Isto pode ser explicado, em parte, pelo facto de que existe uma vantagem seletiva em perder o gene σ^S durante o crescimento em condições favoráveis (ausência de stress). A perda de σ^S em populações em crescimento num bioreactor com restrição de glucose é acompanhada por uma expressão elevada dos genes que contribuem para a aptidão, tais como genes que codificam os sistemas de absorção de glucose (Notley-McRobb, 2002).

Assim, parece haver um “*trade-off*” entre as funções relacionadas com a reprodução e as relacionadas com a manutenção e com a resistência ao stress (Nystrom, 2002).

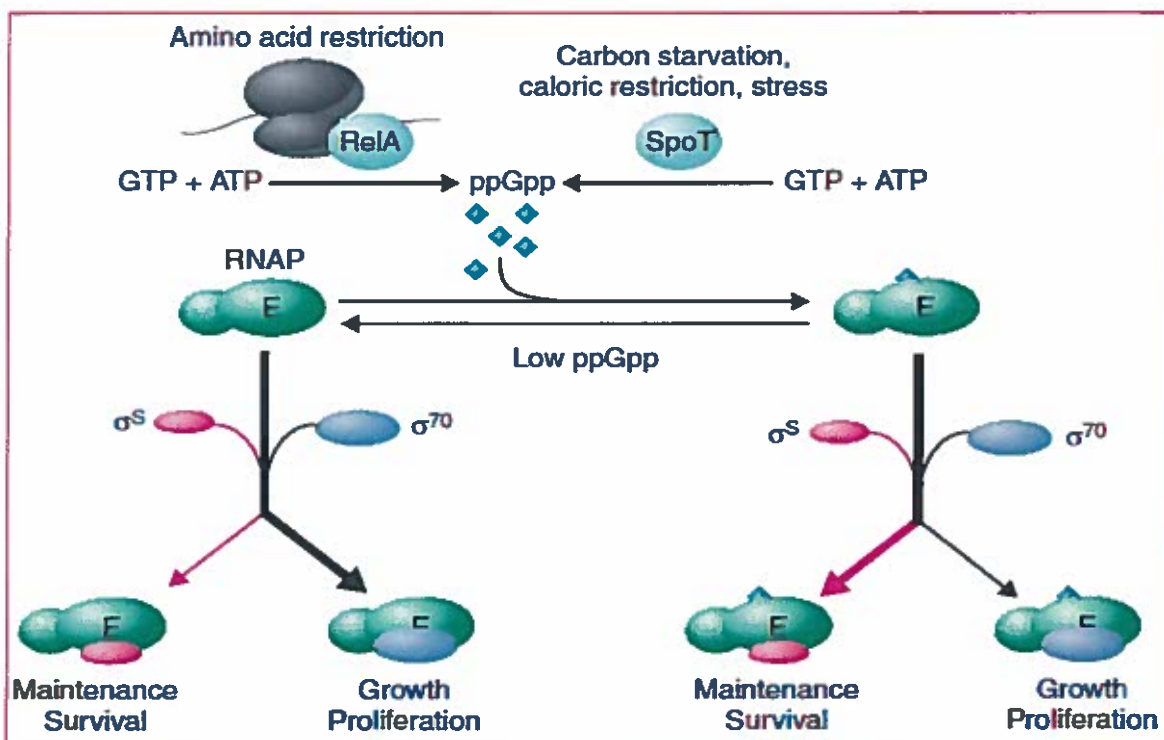


Figura 13: Modelo para o trade-off entre reprodução e sobrevivência (Nystrom, 2002).

4.3.3.2. Trade-off como consequência da competição do fator sigma

O modelo é baseado no argumento de que a RNA polimerase (RNAP) é limitante para a transcrição. O conflito entre as atividades de proliferação (principalmente dirigidos pelo fator sigma de limpeza, σ^{70}) e manutenção (principalmente dirigido por σ^S) provem da competição do fator sigma pela RNA polimerase (Fig. 13). Uma subtil superprodução de σ^{70} efetivamente encerra a transcrição de genes que exigem σ^S e as células tornam-se sensíveis ao stress. Além disso, a sobre-expressão de RpoS, que codifica σ^S , atenua a expressão de genes que requerem σ^{70} . Este antagonismo entre os fatores sigma é regulado pelo nucleotídeo ppGpp, que se acumula durante condições ambientais desfavoráveis (Nystrom, 2002; Jishage, *et al.*, 2002).

Muitos dos genes que requerem fatores sigma alternativos mostraram ser dependentes da ppGpp para a sua indução (Nystrom, 2002).

A dependência de ppGpp está relacionada com a sua capacidade para facilitar a ligação de fatores sigma alternativos (σ^S e σ^{32}) que competem com σ^{70} pela RNA polimerase (Jishage, *et al.*, 2002).

Este facto, faz parte da resposta rigorosa que permite que os fatores sigma alternativos funcionem eficazmente em conjunto com σ^{70} durante o aumento das necessidades de manutenção (Nystrom, 2002).

Como resultado, enquanto os níveis de ppGpp são baixos, sinalizando que o estado nutricional do meio ambiente é favorável para o crescimento, o aparelho de transcrição é ocupado principalmente com a transcrição de genes de proliferação σ^{70} . Contudo, quando as condições são menos favoráveis para a proliferação, ocorre um aumento dos níveis de ppGpp, permitindo que os fatores sigma alternativos, necessários para a expressão de genes de manutenção, trabalhem em conjunto com σ^{70} , deslocando a competitividade relativa dos fatores sigma (Nystrom, 2002).

Os resultados encontram-se em conformidade com a teoria do soma descartável de envelhecimento. Originalmente, a teoria da soma descartável afirmou que há um *trade-off* entre os investimentos em energia necessária, para a obtenção de um determinado nível de precisão na síntese de proteínas e na produção de descendência. Mais tarde, a teoria incluiu todos os tipos de macromoléculas e os mecanismos de manutenção, tais como as vias de reparação de macromoléculas e de defesa contra o stress. A suposição em que essa teoria se baseia, é que os recursos são limitados em qualquer indivíduo e que podem ser canalizados em duas atividades principais, a sobrevivência e reprodução. Além disso, argumenta-se que níveis elevados de atividades de defesa contra o stress promoverão uma longa sobrevivência individual, mas redistribuem os recursos para atividades distintas da reprodução (Nystrom, 2002; Martins, 2011).

Em bactérias não há nenhuma distinção entre células somáticas e células da linha germinativa. No entanto, em *E.coli*, o modelo de competição do fator sigma, fornece uma das poucas explicações sobre os mecanismos moleculares de um *trade-off* entre atividades de reprodução e manutenção, colocando o enfoque sobre a RNA polimerase como chave na alocação de recursos celulares (Nystrom, 2002).

4.3.3.3. A restrição calórica e a competição do fator sigma

Uma forma eficiente para aumentar a expectativa de vida dos roedores, vermes, moscas de fruta e células de levedura é submetê-los a restrição calórica, uma dieta na qual as calorias são limitadas em 30-40 % em comparação com animais alimentados *ad libitum*. No entanto, o mecanismo pelo qual a restrição calórica retarda o envelhecimento não é clara (Nystrom, 2002).

Na bactéria *E. coli*, a restrição da glicose, ativa, a proteína SPOT, que vai catalisar a síntese de ppGpp. Conforme referido acima, isto permite uma elevada expressão de genes de defesa de stress que requerem fatores sigma alternativos (Figura 13). Por outras palavras, molécula de sinalização ppGpp estabelece uma relação entre atividades de reprodução e manutenção com a disponibilidade de nutrientes e restrição calórica (Jishage, *et al.*, 2002). Notavelmente, o aumento da produção de genes de defesa de stress (em particular, choque térmico e genes de defesa de oxidação) é acompanhado pelo aumento da longevidade em muitos sistemas de modelos genéticos (*Daf-3/Daf-16* de *C. elegans*) e é tentador especular que existe umnexo de causalidade entre os dois fenómenos. Possivelmente, a restrição calórica provoca uma realocação de recursos por meio de diferentes sistemas de transdução de sinal (por exemplo spot / RelA / σ^S) e controlo da da molécula de sinalização (ppGpp), sendo que a expressão de genes necessários para a manutenção é favorecida em detrimento de atividades reprodutoras. A questão de como a proteína SPOT é sensível à restrição de energia por privação de carbono é uma questão-chave da biologia molecular e na fisiologia bacteriana que continua a ser estudada (Larsen, 1993; Yasuda, *et al.*, 1999; Nystrom, 2002).

4.3.4. A importância do controlo de qualidade das proteínas na senescência condicional em *E. coli*

As proteínas acabadas de serem sintetizadas têm que adquirir a sua estrutura tridimensional característica, sendo que existe apenas uma conformação na qual as proteínas são extremamente estáveis e possuem propriedades químicas exatas que permitem que a proteína desempenhe a sua função específica na célula (Ramos *et al.*, 2008).

As proteínas são enroladas de uma forma tão precisa que por vezes basta a mudança de um resíduo de aminoácido para perderem a sua função específica.

O correto enrolamento de uma proteína está contido na sequência polipeptídica, porém existem evidências que muitas proteínas recém-sintetizadas, para promoverem o seu enrolamento na forma nativa, necessitam de uma maquinaria celular complexa de chaperonas.

Os chaperonas têm como função proteger as cadeias polipeptídicas nascentes, evitando o mau enrolamento e agregação de proteínas. Sendo a agregação, um problema para as cadeias nascentes que ainda não adquiriram a sua estrutura nativa, pois a agregação remove proteínas irreversivelmente das suas vias produtivas de enrolamento, sendo este obstáculo evitado pelos chaperonas.

Muitas chaperonas, embora sejam expressas constitutivamente, são sintetizadas em concentrações elevadas em condições de stress, sendo por essa razão classificadas como proteínas de stress ou de choque térmico,

Table 1

The genes and proteins mentioned in this review, with and their functions and induction pathways

Gene	Protein name	Function	Induced by
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase	Redox regulation	Oxidative conditions
<i>clpA</i>	ClpA	Chaperone, specificity component of a Clp protease	Starvation, aberrant proteins
<i>clpP</i>	ClpP	Proteolytic subunit of a Clp protease	Heat shock
<i>clpX</i>	ClpX	Chaperone, specificity component of a Clp protease	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>dnaJ</i>	DnaJ	Chaperone	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>dnaK</i>	DnaK	Chaperone, protein management, interacts with DnaJ and GrpE	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>ftsH</i>	FtsH	AAA family protease	Heat shock
<i>gdhA</i>	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Nitrogen metabolism	Nitrogen availability in growth medium
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	Nitrogen metabolism	Nitrogen starvation
<i>groEL</i>	GroEL	Chaperone, protein management, interacts with GroES	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>groES</i>	GroES	Chaperone, modulates the ATPase activity of GroEL	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>grpE</i>	GrpE	Nucleotide exchange factor	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>hslU</i>	HslU	Chaperone subunit of the HslVU protease	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>hslV</i>	HslV	Proteolytic subunit of the HslVU protease	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>iraP</i>	IraP	Inhibitor of RssB activity during phosphate starvation	
<i>leuA</i>	α -isopropylmalate synthase	Leucine biosynthesis	Leucine starvation
<i>lon</i>	Lon	Protease	Heat shock, starvation, aberrant proteins
<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	Methionine biosynthesis	Amino acid starvation
<i>rssB</i>	RssB	Sigma-S adaptor protein	Stationary phase
<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	Redox regulation	Oxidative conditions
<i>uspA</i>	Universal stress protein A	Stress resistance	A large number of stresses
<i>uspD</i>	Universal stress protein D	Stress resistance, iron metabolism	A large number of stresses

Tabela 1: Genes e proteínas com as suas respetivas funções e vias de indução (Fredriksson, 2005).

4.3.4.1. Sistemas de chaperonas em *E. coli*

Na bactéria *E. coli*, a superprodução individual de diferentes sistemas de chaperonas sugere que, o sistema de *DnaK / DnaJ* (ver Tabela 1 para este e outros genes e proteínas aqui mencionadas) é mais importante na defesa celular contra estas modificações oxidativas do que o sistema de GroEL / GroES (Fredriksson, *et al.*, 2005).

A defesa contra a carbonilação induzida na fase estacionária” também necessita das proteases Lon e HslVU, enquanto o papel desempenhado pela ClpP só foi observado em células sem as proteases Lon e HslVU. Contudo, é claro que a ClpPX e a ClpPA têm um papel importante na proteólise da fase estacionária, porque muitas proteínas, incluindo Leua , TrxB , GdhA , glnA , MetK e reductase de hidroperóxido de alquilo, são significativamente mais abundantes na fase estacionária das células em que faltam estas proteases. Na verdade, Weichart *et al.*, sugerem que o abundância da maioria das principais proteínas de fase de crescimento na *E. coli* são reguladas pela atividade das proteases ClpAP e ClpXP (Fredriksson, *et al.*, 2005; Weichart, *et al.*, 2003).

Não é esperado que o sistema de *DnaK / DnaJ* repare ou reenrole as proteínas carboniladas, pois, tanto quanto sabemos, a carbonilação é uma modificação irreversível (Fredriksson & Nystrom, 2006).

A reduzida carbonilação observada em células com superprodução deste sistema de chaperona, pode em vez disso, ser o resultado de uma redução da abundância de proteínas anormais, e / ou de um aumento na solubilidade *DnaK / DnaJ* dependente das proteínas carboniladas (Figura 14).

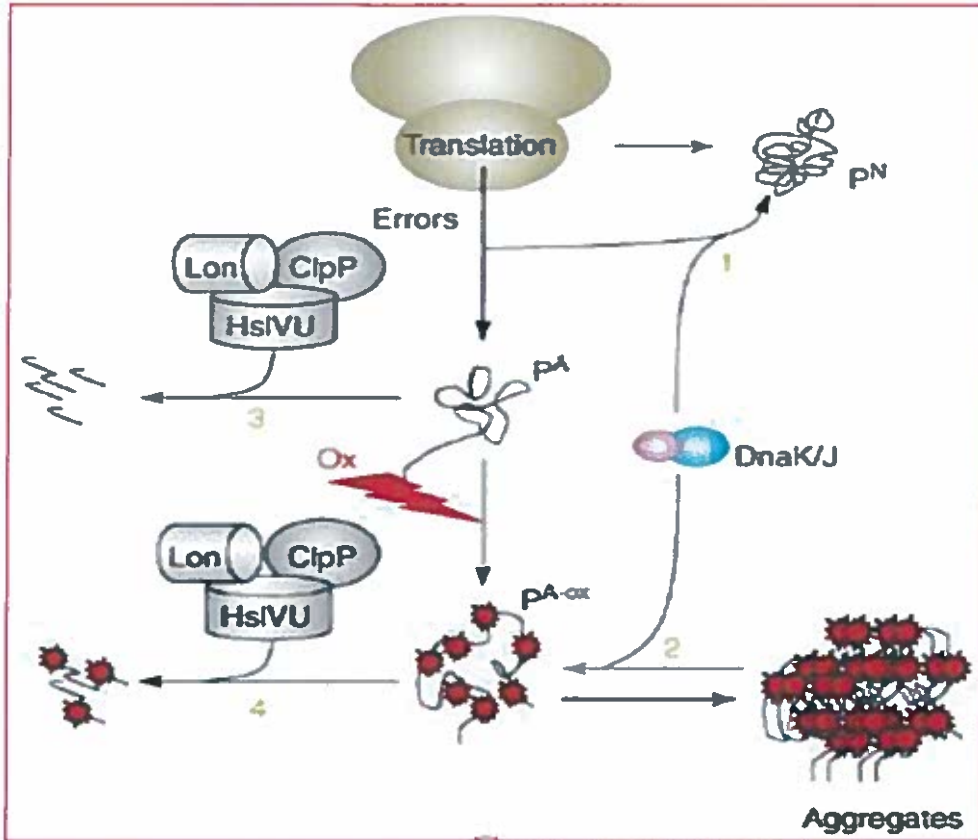


Figura 14: Papel das chaperonas HSP e das proteases na redução da oxidação proteica (Fredriksson & Nystrom, 2006).

A primeira sugestão decorre de dados que demonstram que as formas aberrantes de proteínas são mais suscetíveis a carbonilação oxidativa do que as proteínas nativas. Deste modo, qualquer condição que reduza os níveis das proteínas aberrantes, tais como o aumento da correção/revisão ribossomal ou níveis elevados de DnaK / DnaJ também se espera que reduza os níveis de carbonilo celulares (Dukan, *et al.*, 2000; Fredriksson & Nystrom, 2006).

A segunda ideia resulta da observação de que as proteínas carboniladas são suscetíveis à proteólise, enquanto elas permanecerem solúveis. Contudo, proteínas fortemente carboniladas são propensas a agregação, sendo que, estes elevados agregados moleculares conseguem escapar à proteólise (Bota & Davies, 2002).

O aumento dos níveis de DnaK /DnaJ pode manter as proteínas carboniladas numa forma solúvel, suscetível ao ataque das proteases e, assim, contribuir para a sua degradação, por exemplo, por Lon e HslVU.

No entanto, é claro que em células mutantes que faltam membros específicos do regulão de choque térmico (por exemplo DnaK , ClpP , HslVU e Lon), morrem a um ritmo acelerado na fase estacionária, contudo, não é certo que, os níveis de HSPs constituam uma tábua de sobrevivência das bactérias *E. coli* do tipo selvagem em fase estacionária (Dukan, *et al.*, 2000; Fredriksson, *et al.*, 2005).

Apesar de se concluir que, os genes e os regulões importantes na redução de danos oxidativos são necessários para que as células sobrevivam em fase estacionária (estase), apenas evidências circunstanciais suportam a teoria de que o dano oxidativo é o fator determinante na perda de culturas de *E. coli* em fase estacionária. Para além disso, não é claro, que os danos oxidativos reduzam a sobrevivência de células do tipo selvagem (Fredriksson & Nystrom, 2006).

Por outro lado, a morte na fase estacionária na levedura *S. cerevisiae* foi mais relacionada com o dano oxidativo e alterações genéticas que afetam a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigénio, mostrando-se eficazes para retardar a morte deste sistema modelo na fase estacionária. Contudo, nenhum efeito semelhante, foi obtido no que concerne ao retardamento da senescência condicional em *E. coli* (Aguilaniu, *et al.*, 2001; Fredriksson & Nystrom, 2006).

4.3.5. Papel das proteínas de stress universais na senescência condicional

As proteínas relevantes na função para o retardamento da senescência condicional, são designadas por proteínas do stress universais (PSU), cujas funções estão relacionadas com a defesa ao stress oxidativo (Nachin, *et al.*, 2005).

Tinha sido previamente observado que as proteínas PSU de *E. coli*, sofrem uma indução em resposta à paragem de crescimento (Kvint, *et al.*, 2003).

Encontram-se descritas seis proteínas PSU distintas para *E. coli* que podem ser divididas em quatro classes em função dos seus motivos estruturais. Uma série de mutantes foram desenhados com o objetivo de analisar a função de cada classe de proteínas PSU e, ao contrário da expectativa, a análise mostrou que estas PSU têm funções distintas que se sobrepõem (Fredriksson & Nystrom, 2006).

Especificamente, duas das três proteínas da classe I, PsuA e a PsuD, estão envolvidas na defesa contra o stress oxidativo. Além disso, PsuD está envolvida na eliminação do ferro intracelular. Diferentes mutantes de PSU foram muito afetadas na sua capacidade de adesão e motilidade (Nachin *et al.*, 2005).

Com base nestes resultados, foi sugerido que as proteínas PSU estão envolvidas na reprogramação da célula para a defesa do stress e para a fuga, uma versão bacteriana da resposta "fight or flight" (Nachin *et al.*, 2005).

4.3.6. Oxidação proteica como sinal de indução de proteção cruzada

Além de estarem envolvidos na redução da oxidação induzida por estase, e na indução eficiente do choque térmico, o regulão, demonstrou, que, mediante privação de nutrientes necessita da presença de oxigénio (Fredriksson *et al.*, 2006).

Foi proposto que o papel do oxigénio no desencadeamento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP) está intimamente relacionado com a observação de que as proteínas mal traduzidas são suscetíveis à oxidação, e que esta oxidação promove uma nova perda da integridade estrutural da proteína. Isto, por sua vez, resulta numa maior exposição das superfícies hidrofóbicas, aumentando os locais-alvo para o sistema de apoio DnaJ -DnaK - GrpE , o modulador negativo da resposta HSP (Figura 15) (Dukan, *et al.*, 2000; Bota & Davies, 2002; Fredriksson & Nystrom, 2006).

O efeito do oxigénio sobre a expressão do gene *HSP* pode ser exercido através da oxidação prejudicial da DnaK .

A fração maior de DnaK é oxidada e mostra sinais de integridade estrutural aberrante em células que passaram por privação de nutrientes na presença de oxigênio, quando comparado com aquelas que passaram por privação de nutrientes na ausência de oxigênio (Fredriksson *et al.*, 2006).

Possivelmente, esta estrutura aberrante e mais aberta pode tornar DnaK não-funcional, o que conduziria a um maior nível de síntese de HSP devido à diminuição da degradação da σ^{32} (Fredriksson & Nystrom, 2006).

Em consonância, um estudo recente mostra que DnaK é reversivelmente inativada em condições de stress por calor e na presença de H_2O_2 . Esta inativação foi associada a uma diminuição significativa dos níveis de ATP celular por H_2O_2 , levando à privação de nucleótido N-terminal ATPase do domínio da DnaK, a qual, em consequência, se torna termolábil e se desdobra. De salientar que, a re-dobragem *in vitro* do DnaK inativada necessita da presença de um agente redutor, por exemplo, a remoção do stress e a adição de ATP não foi suficiente, o que implica que o desdobramento sofre modificação oxidativa.

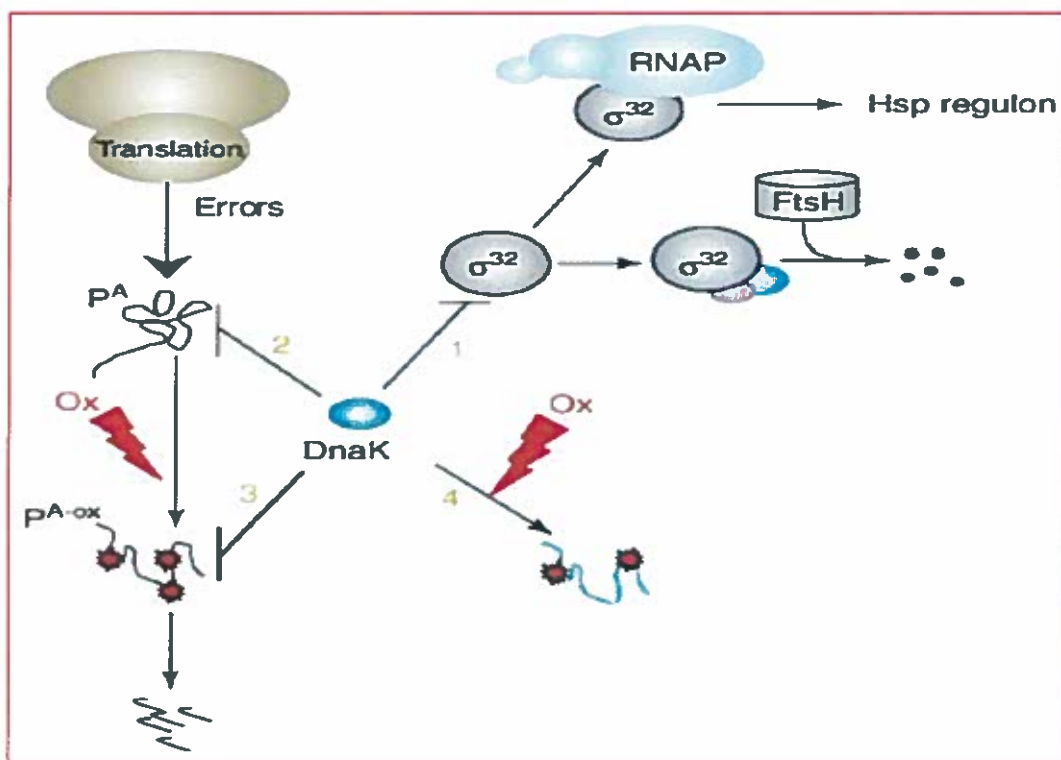


Figura 15: Possíveis locais de envolvimento de oxigênio no desencadeamento do regulão do choque térmico durante a entrada das células na fase estacionária.

O sistema da chaperona DnaK, juntamente com o DnaJ, servem como moduladores negativos do regulão HSP pela ligação ao fator sigma de choque térmico σ^{32} , facilitando a sua degradação pela protéase FtsH (Figura 15).

Após privação de nutrientes a taxa de erros de tradução é elevada e o aumento do tamanho do conjunto de proteínas aberrantes (P^A) pode potencialmente titular as chaperones DnaK/DnaJ. No entanto, estes desvios estruturais das proteínas não são suficientes para atrair o sistema de chaperona e induzir a expressão de HSP. Contudo, estas proteínas aberrantes são suscetíveis à oxidação e esta oxidação promove ainda mais a perda da integridade estrutural das proteínas (P^{A-ox}) e deste modo, induz a expressão de HSP.

Na P^{A-ox} há um aumento da exposição de superfícies hidrofóbicas, aumentando os locais de destino para o sistema de chaperona DnaK/J/GrpE, levando à estabilização de σ^{32} , que dirige a polimerase para os genes HSP, resultando num aumento de produção de HSP.

DnaK, tal como a maioria das proteínas da família Hsp70, são extremamente sensíveis a carbonilação oxidativa, podendo ela mesma em condições de limitação de nutrientes e stress, sofrer danos oxidativos e ligar-se à σ^{32} .

V. A Senescência pode explicar a persistência microbiana

Estudos revelaram que muitos dos agentes antimicrobianos, apesar de reduzirem eficazmente as populações bacterianas, são incapazes de as eliminar totalmente, mesmo após exposição prolongada (Wiuuff *et al.*, 2005; Klapper, *et al.*, 2007).

As bactérias sobreviventes, designadas de persistentes, podem existir em pequeno número, em 1944 Maior relatou um número inferior a 100 *Staphylococcus pyogenes* persistentes após exposição à penicilina de 2,56107 bactérias. As bactérias persistentes são posteriormente capazes de recolonização após a remoção do agente antimicrobiano (Spoering & Lewis, 2001).

Este fenómeno adquiriu uma maior atenção no contexto de biofilmes, onde as células persistentes têm a proteção adicional da matriz extracelular rica em substâncias poliméricas, tornando-as particularmente perigosos (Roberts & Stewart, 2004, 2005 ; Ayati & Klapper, 2007).

Pelo facto dos biofilmes proporcionarem um crescimento celular lento ou até mesmo nulo, é esperado que aumentem a proteção das populações microbianas através da persistência, seja esta adquirida pela senescência ou por um outro mecanismo (Klapper *et al.*, 2007).

5.1. Características das células persistentes

As células persistentes apresentam uma série de características interessantes, sendo uma das quais não parecerem possuir qualquer variante genética, uma vez que, as células persistentes não transmitem a sua tolerância aos descendentes, que são células jovens e ativas que não herdam qualquer tendência para se tornarem persistentes. Outra das suas características prende-se com o facto destas células demonstrarem tolerância após exposição a uma série de agentes antimicrobianos. Para além disso, estas células, após re-cultura são capazes de repovoar (Klapper *et al.*, 2007).

Sufya *et al.* (2003) demonstrou que numa cultura de bactérias *E.coli* resistente a uma tetraciclina, quando exposta a outros agentes, também se mostrou tolerante à ciprofloxacina e a compostos de amónia quaternária.

Em resposta ao desafio antimicrobiano, as culturas bacterianas demonstram padrões de morte bifásicos, tendo sido sugerido que este fato é uma consequência da presença de bactérias persistentes, isto porque na presença de um agente antimicrobiano, as células que não são persistentes morrem rapidamente e em seguida, a um ritmo mais lento morrem as persistentes.

É sugerido que a persistência se apresenta como um fenómeno fenotípico. Balaban *et al.* (2004), Roberts & Stewart (2005) e Cogan (2006) propuseram modelos em que as

células persistentes têm estados de crescimento transientes entre o crescimento lento e o nulo, com probabilidades que são possivelmente dependentes das condições ambientais.

Neste contexto, com base em observações de senescência microbiana (Ackermann *et al.*, 2003; Barker & Walmsley, 1999; Mortimer & Johnston, 1959; Stewart *et al.*, 2005), Klapper, *et al.* (2007), propuseram um mecanismo alternativo simples que pode explicar todas as propriedades acima mencionadas.

Como já referido, a citocinese em células microbianas, mesmo em divisões simétricas, a célula-mãe mantém a sua identidade, isto é, a divisão é funcionalmente assimétrica. Sendo também referido que a célula-mãe mostra aumento de senescência ao longo de um certo número de divisões celulares, retardando gradualmente a sua taxa de crescimento.

Ao introduzir esta ideia de senescência, Klapper *et al.* (2007) realizaram três premissas essenciais, sendo elas: que as células bacterianas envelhecem (envelhecimento aqui é baseado em senescência); que as células mais velhas são mais tolerantes do que as células mais jovens ao desafio antimicrobiano, e que o crescimento se manifesta à medida que se vão produzindo novas células. Isto é, após a divisão celular, uma das células filha herda os efeitos do envelhecimento enquanto a outra não.

Neste contexto, consideram-se as células senescentes como sendo as células persistentes.

Uma segunda suposição, é a de que a persistência seria uma consequência, da diminuição da taxa de crescimento. O terceiro pressuposto, leva em conta a interpretação da divisão celular como o nascimento de uma nova célula jovem a partir de uma célula envelhecida.

Deste modo, Klapper, *et al.* propuseram premissas adicionais não-essenciais para esta definição, que dizem que, a taxa de produção de novas células diminui com a idade, apesar disso, permanece superior a zero; a morte celular ocorre a uma taxa constante;

uma dada concentração de agente antimicrobiano aplicado, matará células suficientemente jovens, mas não vai afetar as células mais velhas.

A importância destes pressupostos extra encontra-se nos detalhes, contudo, não afeta os resultados qualitativos, com exceção do pressuposto que afirma que a taxa de crescimento nunca é zero, facto esse necessário, a fim de permitir que existam células capazes de repovoar após a aplicação de um agente antimicrobiano.

A explicação mais atrativa para a ocorrência de persistência é assumir que esta não é mais do que um sintoma de senescência. Isto é, a tolerância ocorre devido à senescência, isto porque há uma taxa de crescimento reduzida.

Todas estas observações são propriedades qualitativas deste modelo de acordo com as suposições e, acredita-se, essencialmente independente das escolhas particulares feitas nas outras hipóteses.

Uma via alternativa do fenómeno de persistência é o envelhecimento assimétrico. Considerando que o conceito de célula persistente invoca, a transição entre persistente e não persistente, o conceito de envelhecimento em contraste, requer uma distribuição de idades de células numa população e uma correlação entre a idade e a suscetibilidade. Além de supor o envelhecimento como um mecanismo para gerar células persistentes, sugere-se que o envelhecimento assimétrico como um mecanismo para gerar fenótipos distribuídos, tal como a suscetibilidade antimicrobiana, dentro de uma população.

VI. Descoberta recente...

O dogma de que todos os organismos vivos envelhecem acaba de ser quebrado, isto é, a ideia de que todos os organismos unicelulares estavam sujeitos a um processo de envelhecimento está agora em causa.

Em organismos unicelulares o envelhecimento é definido como uma diminuição da capacidade reprodutora, sendo que o tempo de divisão celular vai gradualmente aumentando; aumentando também a probabilidade de morte celular com o número de divisões.

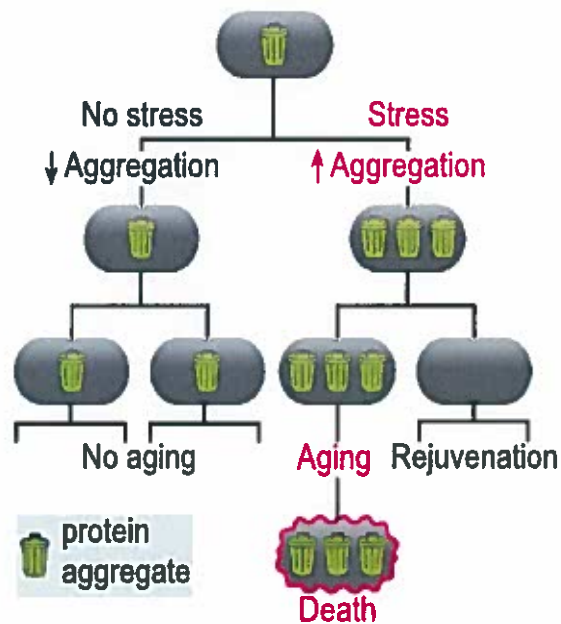


Figura 16: Representação esquemática da transição entre envelhecimento e não-envelhecimento da *S. pombe* (Coelho, *et al.*, 2013).

Postulou-se que nestes microrganismos a segregação assimétrica de danos celulares e fatores de envelhecimento, permitem identificar e distinguir após cada divisão celular, a célula-mãe envelhecida da célula-filha rejuvenescida. Conduzindo à interpretação de que o envelhecimento é promovido pela conservação das suas próprias características, sendo preservado em todos os organismos vivos.

Contudo, o papel da segregação assimétrica levantou a hipótese de que a igualdade de distribuição dos fatores de envelhecimento poderia prevenir esse mesmo envelhecimento.

Coelho, *et al.* (2013), realizaram uma análise a partir de células individuais de microcolônias crescentes da levedura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), examinando o número de divisões, a hereditariedade dos componentes celulares e a morte celular em várias linhagens.

Quando estas células foram cultivadas em condições favoráveis, nenhuma das linhagens apresentou sinais de envelhecimento, ou seja, apesar de se ter observado a morte de algumas células, esta morte foi aleatória e repentina, não existindo um aumento gradual do tempo de divisão celular que pudesse eventualmente conduzir as células à sua morte.

Contudo, este estudo também demonstrou, que sob condições de stress a segregação assimétrica de agregados de proteínas correlaciona-se, e provavelmente, faz com que a divisão celular seja mais lenta e que eventualmente cause morte celular (figura 16). Conduzindo à interpretação de que a levedura *S. pombe* é capaz de evitar o envelhecimento sob condições favoráveis, mas que envelhece quando sujeita a stress.

Estes investigadores desafiaram o paradigma atual que argumenta que todos os organismos envelhecem, ao não detectarem qualquer sinal de processo de envelhecimento em células da levedura *S. pombe* cultivadas em condições favoráveis.

VII. Conclusão

As teorias biológicas explicam algumas características do envelhecimento, mas os múltiplos mecanismos envolvidos no processo ainda não são completamente conhecidos.

Os avanços na compreensão dos mecanismos subjacentes ao envelhecimento já possibilitam a identificação de interações entre os processos. Contudo, os estudos científicos sobre o tema permitem a constatação de que a complexidade etiológica do fenómeno representa um desafio.

Nas células eucariontes, são múltiplos os fatores que desencadeiam o processo de senescência.

Sendo a *S.cerevisiae* o modelo eucarionte unicelular mais utilizado para estudos de envelhecimento celular, mostrando uma variedade de mecanismos implicados na progressão do processo de senescência. Porém, ao contrário do esperado, existem estirpes desta levedura cujo encurtamento dos telómeros parece não ocorrer e consequentemente não afetar a longevidade destas estirpes, sendo o processo de senescência necessariamente desencadeado por outros mecanismos.

O estudo do envelhecimento em bactérias ilustra um desenvolvimento importante na biologia experimental ao permitir a análise de células individuais.

Estes estudos abalaram a convicção de que estes seres unicelulares não eram afetados por este processo de envelhecimento, concluindo que de facto estes seres imortais também morrem pela passagem de tempo.

Havendo a percepção que, no que diz respeito aos microrganismos, a medida crítica de envelhecimento poderá estar relacionada com a redução na capacidade reprodutiva, havendo um aumento dos intervalos entre gerações, resultando numa redução do número de descendentes.

A senescência condicional em células bacterianas, surge quando estas entram num estado não proliferativo devido a fatores externos como o esgotamento de nutrientes, levando-as a perder gradualmente a sua capacidade de recuperação e divisão. Estas células “estéreis” inicialmente permanecem intactas, mas podem eventualmente, perder a integridade da sua membrana citoplasmática, assim como, outras atividades de apoio à vida.

A análise da senescência condicional em *E. coli* revelou semelhanças interessantes com o processo de envelhecimento dos organismos eucariotas fornecendo mecanismos que sustentem algumas teorias do envelhecimento, incluindo a hipótese de radicais livres do envelhecimento e da teoria soma descartável.

VIII. Bibliografia

Ackermann, M. (2008). Bacteria as a new model system for aging studies: investigations using light microscopy. *Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Switzerland*. 44(4), pp. 564-567.

Ackermann, M., Lin, C., Bergstrom, C. T., Doebeli, M. (2007). On the evolutionary origin of aging. *Aging Cell*. 6, pp. 235-244.

Ackermann, M., Stearns, S. C., Jenal, U. (2003). Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science*. 300, pp. 1920.

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., Nystrom, T. (2001). Protein oxidation depends on the state rather than rate of respiration in *Saccharomyces cerevisiae* cells in the G0 phase. *Journal of Biology Chemistry*. 276, pp. 35396-35404.

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., Nystrom, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*. 299, pp. 1751-1753.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raffi, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Biologia molecular da celula*, 4ª edição. ARTMED.

Andreu, G. P., Casaña, P. H., Hernández, R. D. (2005). La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Revista Cubana de Medicina*, 44, pp. 1-2.

Ayati, B. P. & Klapper, I. (2007). A multiscale model of biofilm as a senescence-structured fluid. *Multiscale model simulation*. 6, pp. 347-365.

Ayyadevara, S., Alla, R., Thaden, J., Reis, R. J. S. (2007). Remarkable longevity and stress resistance of nematode pi3k-null mutants. *Aging cell*. 7(1), pp. 13-22.

Balcombe, N., Sinclair A. (2001). Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Practice Results in Clinical Gastroenterology*. 15(6), pp. 835-849.

Barker, M. G., Smart, K. A. (1996). Morphological changes associated with the cellular ageing of a brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 54, pp. 121-126.

Blackburn, E. (2000). Telomere states and cell fates. *Nature*. 408, pp. 53-56.

Bota, D. A. & Davies, K. J. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature Cell Biology*. 4, pp. 674-680.

Campisi, J. (2003). Cellular senescence and cell death. *Physiological basis of aging and geriatrics*. 3, pp. 47-59.

Campisi, J., Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 8, pp. 729-740.

Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., Linskens, M. H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 265, pp. 294-303.

Childress, A. M., Franklin, D. S., Pinswasdi, C., Kale, S., Jazwinski, S. M. (1996). LAG2, a gene that determines yeast longevity. *Microbiology*. 142, pp. 2289-2297.

Chiu, C. P., Harley, C. B. (1997). Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 214, pp. 99-106.

Coates, P. J., Jamieson, D. J., Smart, K. A., Hall, P. A. (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Current Biology*. 7, pp. 607-610.

Congdon, J. D., Nagle, R. D., Kinney, O. M., van Loben Sels, R. C., Quinter, T. and Tinkle, D. W. (2003). Testing hypotheses of aging in long-lived painted turtles (*Chrysemys picta*). *Experimental Gerontology*. 38, pp.765-772.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*. 4, pp. 1798-1806.

Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T. M., Fullen, D. R., Pointer, J. N., Gruber, S. B., Su, L. D. and Nikiforov, M. A. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature Cell Biology*. 8, pp. 1053-1063.

Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., Nystrom, T. (2000). Proteins are oxidatively carbonilated in response to reduced transcriptional or translational fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97, pp. 5746-5749.

Egilmez, N. K., Chen, J. B., Jazwinski, S. M. (1989). Specific alterations in transcript prevalence during the yeast life-span. *Journal of Biological Chemistry*. 264, pp. 14312-14317.

Fredriksson, A., Ballesteros, M., Dukan, S., Nystrom, T. (2005). Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *Journal of Bacteriology*. 187, pp. 4207-4213.

Fredriksson, A., Ballesteros, M., Dukan, S., Nystrom, T. (2006). Induction of the heat shock regulon in response to increased mistranslation requires the presence of oxygen. *Molecular Microbiolog*. 59, pp. 350-359.

Fredriksson, A., Nystrom, T. (2006). Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*. 9, pp. 612-618.

Gavrilov, L., Gavrilova, N., Leonid A. (2002). Evolutionary theories of aging and longevity. *The Scientific World Journal*. 2, pp. 339-356.

Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J. M., Dulic, V. (2004). Damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J*. 23, pp. 2554-2563.

Goldsmith, T. C. (2008). Aging, evolvability, and the individual benefit requirement: medical implications of aging theory controversies. *Journal of Theoretical Biology*. 252(4), pp. 764-768.

Grant, C. M., MacIver, F. H., Dawes, I. W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 410, pp. 219-222.

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. and Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97, pp. 503-514.

Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y., Greider, C. W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 107, pp. 67-77.

Hengge-Aronis, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. In *Bacterial Stress Responses*. *American Society of Microbiology*. pp. 161-179.

Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., Sedivy, J. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16 (INK4a). *Cell*. 14, pp. 501-513.

Holliday, R. (1996). Endless quest. *Bioessays CSIRO Division of Biomolecular Engineering*. 18, pp. 3-5.

Jazwinski, S. M. (1995). Nuclear genes in ageing. *Molecular Aspects of Aging*. pp. 15-28.

Karen, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*. 230, pp. 13-18.

Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Guarente, L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *Journal of Cellular Biology*. 127, pp. 1985-1993.

Kirkwood, T. (2002). Evolution of ageing. *Mechanisms of Ageing Development*. 123(7), pp. 737-745.

Klapper, I., Gilbert, P., Ayati, P., Dockery, J., Stewart, P. S. (2007). Senescence can explain microbial persistence. *Microbiology*. 153, pp. 3623-3630.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*. 24, pp. 2463-2479.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 113, pp. 3613-3622.

Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., Nystrom, T. (2003). Bacterial universal stress proteins: function and regulation. *Current Opinion Microbiology*. 6, pp. 140-145.

Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 90(19), pp. 8905-8909.

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*. 5, pp. 187-195.

Lew, D. J. & Reed, S. I. (1995). A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *Current Opinion Genetic*. 129, pp. 739- 740.

Ljubuncic, P., Reznick, A. Z. (2009). The evolutionary theories of aging revisited a mini-review. *Gerontology – Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine*. 55, pp. 205-216.

Mangan, E. K., Malakooti, J., Caballero, A., Anderson, P., Ely, B., Gober, J. W. (1999). FlhT couples flagellum assembly to gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 181(19), pp. 6160-6170.

Martins, A. (2011). Change and aging senescence as an adaptation. *PLoS ONE*. 6(9).

Mitteldorf, J. (2010). Evolutionary origins of aging. *The future of aging, pathways to human life extension*. 6, pp. 87-126.

Nachin, L., Nannmark, U., Nystrom, T. (2005). Differential roles of the universal stress proteins in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology*. 187, pp. 6265-6272.

Narita, M. Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., Lowe, S. W. (2003). Rb-Mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113, pp. 703-716.

Nurse, P., Masui, Y., Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Natural Medicine*. 4, pp. 1103-1106.

Nussbaum, R., McInnes, R. R., Willard, H. F. (2007). Thompson & Thompson Genetics in Medicine. *Saunders Elseiver*, 7th edition, pp. 59-88; 461-484.

Nystrom, T. (2002). Aging in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 5. pp. 596-601.

Nystrom, T. (2007). A bacterial kind of aging. *PLoS Genetics*. 6(12).

Osiewacz, H. D. (1997). *Genetic Regulation of aging*. Journal of Molecular Medicine. 75, pp. 715-727.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*. 5, pp. 741-747.

Pennington, J. M., Rosenberg, S. M. (2007). Spontaneous DNA breakage in single living *Escherichia coli* cells. *Nature Genetics*. 39, pp. 797-802.

Powell, C. D., Van Zandycke, S. M., Quain, D. E. and Smart, K. A. (2000). Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*. 146, pp. 1023-1034.

Ramos, P. C., Matias, A. C., Marques, A. J. (2008). Chaperones moleculares – os mestres do origami. *Química*. 109, pp. 31-39.

Roberts, M. E. & Stewart, P. S. (2004). Modeling antibiotic tolerance in biofilms by accounting for nutrient limitation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48, pp. 48-52.

Roberts, M. E. & Stewart, P. S. (2005). Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*. 151, pp. 75-80.

Sharpless, N. E. & DePinho, R. A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.*, 113, pp. 160-168.

Sinclair, D. A., Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles- a cause of aging in yeast. *Cell*. 91, pp. 1033-1042.

Sinclair, D. A., Mills, K., Guarente, L. (1998). Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochemical Scientific*. 23, pp. 131-134.

Skerker, J. M., Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nature Reviews Microbiology*. 2, pp. 325-337.

Spoering, A. L. & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. 183, pp. 6746- 6751.

Spoering, A. L., Vulic, M., Lewis, K. (2006). *glpD* and *PlsB* participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 188, pp. 5136-5144.

Stephens, C. (2005). Senescence: even bacteria get old. *Curret Biology*.15(8), pp. 308-310.

Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G., Taddei, F. (2005). Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biology*. 3, pp. 45.

Stewart, G. (1996). Yeast performance and management. *The Brewer*. 82, pp. 211-215.

Sufya, N., Allison, D. G., Gilbert, P. (2003). Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *Journal of Applied Microbiology*. 95, pp. 1261-1267.

Sun, J., Kale, S. P., Childress, A. M., Pinswasdi, C., Jazwinski, S. M. (1994). Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *Journal of Biological Chemistry*. 269, pp. 18638-18645.

Teixeira, I., Guariento, M. (2010). Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives. *Ciência e saúde coletiva*. 15(6), pp. 2845-2857.

Troen, B. R. (2003). The biology of aging. *Department of Geriatrics and Adult Development*. 70(1), pp. 3-22.

Vlamiş-Gardikas, A., Potamitou, A., Zarivach, R., Hochman, A., Holmgren, A. (2002). Characterization of Escherichia coli null mutants for glutaredoxin 2. *Journal of Biology Chemistry*. 277, pp. 10861-10868.

Wai, Y. H., Pang, C. Y., Lee, H. C., Lu, C. Y. (1998). Roles of mitochondrial DNA mutation and oxidative damage in human aging. *Current Science*. 74, pp. 887-893.

Walker, G. M. (1998). Control of yeast growth and cell division. *Yeast physiology and biotechnology*. pp. 112-127.

Watve, M., Parab, S., Jogdand, P., Keni, S. (2006). Aging may be a conditional strategic choice and not an inevitable outcome for bacteria. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 103, pp. 14831-14835.

Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M., Hengge-Aronis, R. (2003). Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*. 185, pp. 115-125.

Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Molecular Cell*. 17, pp. 381-392.

Wuuff, C., Zappala, R. M., Regoes, R. R., Garner, K. N., Baquero, F., Levin, B. R. (2005). Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49, pp. 1483-1494.

Yang, N. C., & Hu, M. L. (2005). The limitations and validities of senescence associated β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology*. 40, pp. 813-819.

Yasuda, K., Adahi, H. Fujiwara, Y. Ishii, N. (1999). Protein carbonyl accumulation in aging dauer formation-defective (daf) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Gerontology*. 54, pp. 47-51.