

Carla Alexandra Ribeiro Cerqueira de Lemos

Aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2015

Carla Alexandra Ribeiro Cerqueira de Lemos

Aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2015

Carla Alexandra Ribeiro Cerqueira de Lemos

Aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Declaro que o presente trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material bibliográfico necessário se encontra devidamente referenciado.

Aluno:

(Carla Alexandra Lemos)

Projeto de Pós-Graduação / Dissertação apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora
Maria Gil Roseira Ribeiro

Resumo

Os telómeros são estruturas nucleoproteicas heterocromáticas de comprimento variável presentes nas extremidades dos cromossomas. Os telómeros, conjuntamente com a telomerase, permitem ultrapassar a limitação replicativa dos segmentos terminais de DNA que se verifica na maioria das células humanas somáticas e que está associada à diminuição do comprimento do DNA telomérico em cada divisão celular.

As estruturas cromossómicas teloméricas são constituídas por longas extensões de repetições hexaméricas 5'-TTAGGG-3' de cadeia dupla e por um complexo proteico específico designado por *shelterin*. As suas principais funções incluem a proteção das extremidades dos cromossomas contra uma eventual fusão ou degradação prematura da molécula de DNA, regulação da síntese de DNA telomérico e regulação/manutenção do comprimento do telómero. Os telómeros de mamíferos são transcritos por ação da RNA polimerase II a partir de vários *loci* subteloméricos e as moléculas de RNA produzidas são constituídas por um número variável de repetições da sequência 5'-UUAGGG-3'. A sua associação ao telómero ocorre através da formação do segmento híbrido RNA-DNA ou da interação de ribonucleoproteínas específicas. Apesar da função deste transcripto ainda não estar completamente estabelecida, várias evidências sugerem a sua participação no processo de regulação do comprimento dos telómeros através de vários mecanismos: inibição da atividade da telomerase, ativação de exonucleases, regulação do nível de eucromatina e/ou atuação como fator de proteção.

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico constituído por uma parte central, que inclui a subunidade catalítica com atividade de transcriptase reversa, e por RNA, que representa a sequência molde para a síntese do DNA telomérico. A sua biossíntese, maturação e atividade catalítica estão relativamente bem caracterizadas. A base molecular para a regulação da atividade da telomerase é complexa e envolve vários níveis de controlo, principalmente transcripcional. No entanto, existem diversas evidências que sugerem que a enzima é também submetida a processos de controlo pós-transcripcional e pós-traducional.

Dada a relação observada entre o comprimento do DNA telomérico e processos celulares aparentemente antagónicos tais como o envelhecimento e a tumorigénese, pretende-se com o presente trabalho de revisão bibliográfica caracterizar os principais aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase e compreender o seu papel na manutenção do comprimento dos telómeros. Adicionalmente, é explorada a importância do conhecimento sobre a biologia molecular e celular deste complexo para a identificação e o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção do envelhecimento ou do cancro.

Palavras-chave: Telómero, Telomerase, Comprimento do telómero, Envelhecimento, Cancro.

Abstract

Telomeres are heterochromatic nucleoproteic structures of varying length present at the ends of chromosomes. Telomeres, together with the telomerase, allow to overcome the limitation imposed by terminal DNA segments of chromosome to the semi-conservative DNA replication of most human somatic cells, which is associated with the decreased length of telomeric DNA in each cell division.

The telomeric chromosomal structures are composed of long extensions of double stranded hexameric repetitions 5'-TTAGGG-3' and a specific proteinaceous complex termed as shelterin. The main functions of this nucleoprotein complex include the protection of the chromosomal endings against an eventual fusion or premature DNA degradation, regulation of the telomeric DNA synthesis and regulation/maintenance of the telomere length. The telomeres of mammals are transcribed through the action of RNA polymerase II from several subtelomeric *loci*. The produced RNA molecules are composed of a variable number of 5'-UUAGGG-3' sequence repetitions. The association of this RNA molecule with telomeres occurs through the formation of a RNA-DNA hybrid or interaction of ribonucleoproteins. Although the function of this transcript molecule is not completely established, yet, several evidences suggest its participation in the process of regulation of telomere length through several mechanisms: telomerase activity inhibition, exonucleases activation, regulation of the chromatin level and/or protection factor.

The telomerase is a ribonucleoprotein complex formed by a central core including the catalytic subunit with activity of reverse transcriptase and RNA, which represents the template sequence used in the telomeric DNA elongation. The biosynthesis, maturation and catalytic activity of telomerase are relatively well characterised. The molecular basis of telomerase activity regulation is complex and involve several levels of control, mainly the transcriptional level. Nonetheless, several evidences suggest that enzyme is also subjected to pos-transcriptional and pos-traditional regulation.

Given the relation observed between the length of telomeric DNA and the apparently antagonic processes of aging or tumorigenesis, the present work of bibliographic review aims to characterise the main structural and functional aspects of the complex telomere/telomerase and to understand its role in the maintenance of telomere length. Additionally, it also explores the importance of the knowledge on the molecular and cell biology of this complex to the identification and development of novel approaches to prevent aging or cancer.

Key-words: Telomere, Telomerase, Telomere length, Aging, Cancer.

Agradecimentos

Agradeço imenso à minha orientadora Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro, por todo o tempo e dedicação despendido para a realização do presente trabalho.

À minha família, em especial ao meu Marido, por toda a disponibilidade, apoio, compreensão e amor com que sempre me presentearam.

Índice Geral

Resumo	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos	vii
Índice de Figuras	ix
Abreviaturas e Siglas	x
Capítulo I- Introdução	1
Capítulo II- Desenvolvimento.....	3
1. Base cromossómica da hereditariedade	3
1.1. Estrutura da molécula de DNA	3
1.2. Mecanismo da replicação do DNA	5
1.3. Organização do DNA em cromossomas	9
2. Estrutura e função dos telómeros.....	14
2.1. DNA telomérico e proteínas associadas.....	14
2.2. TERRA: DNA telomérico não codificante	16
2.3. Métodos de análise do comprimento dos telómeros	18
3. Telomerase humana.....	22
3.1. Estrutura da enzima e domínios funcionais.....	22
3.2. Biossíntese e maturação	25
3.3. Ação enzimática	27
3.4. Regulação da atividade enzimática	30
4. Regulação do nível de TERRA e comprimento dos telómeros	34
5. Impacto biológico de alterações no comprimento dos telómeros.....	36
Capítulo III- Conclusão	43
Capítulo IV- Bibliografia	46

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura da molécula de DNA.....	4
Figura 2- Replicação da molécula de DNA segundo o modelo semi-conservativo	6
Figura 3- Formação do complexo pré-replicação.....	7
Figura 4 - Representação esquemática da síntese das cadeias <i>leading</i> e <i>lagging</i> na zona da forquilha de replicação.....	8
Figura 5- Visão simplificada do ciclo celular eucariótico	10
Figura 6- Compactação da Cromatina	11
Figura 7- Sequências de DNA de um cromossoma eucariótico funcional	13
Figura 8 – Estrutura do complexo telómero/ <i>shelterin</i>	15
Figura 9 – Biogénese, associação e dissociação de TERRA.....	17
Figura 10 - Cronograma dos principais métodos de medição do comprimento dos telómeros.....	19
Figura 11 - Região terminal dos braços do cromossoma	20
Figura 12 – Estrutura dos domínios da telomerase humana.....	23
Figura 13- Biogénese e produção da telomerase humana	26
Figura 14 – Síntese do telómero pela telomerase	29
Figura 15 – Impacto biológico do comprimento dos telómeros.....	39

Abreviaturas e Siglas

A- Adenina

ATP- Trifosfato de adenosina

C-Citosina

CTE- Extensão C- terminal

DC- Disqueratose congénita

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DNMT1- *DNA(cytosine-5-)methyltransferase 1*

DNMT3b- *DNA(cytosine-5-)methyltransferase 3 beta*

dNTP- Desoxirribonucleósido trifosfato

E3- Ubiquitina ligase

FISH- *Fluorescence in situ hybridization*

G- Guanina

HT- *High-throughput*

hTERT- *Human telomerase reverse transcriptase*

IFD- *Insertion in fingers domain*

Myc- Fator de transcrição codificado pelo gene *Myc*

ORC- *Origin recognition complex*

p53- Proteína codificada pelo gene supressor de tumor *p53*

POT1- *Protection of telomeres protein 1*

PCR- *Polymerase chain reaction*

Q- *Quantitative*

RAP- *Repeat addition processivity*

RAP1- *Repressor/Activator protein 1*

RNA- Ácido ribonucleico

RNP- Ribonucleoproteína

RT- Transcriptase reversa

Sp1- Fator de transcrição codificado pelo gene *SP1*

T- Timina

TEN- *Telomerase essential N- terminal*
TER- *Telomerase RNA*
TERC- *Telomerase RNA component*
TERRA- *Telomeric repeat-containing RNA*
TERT- *Telomerase reverse transcriptase*
TIN 2- *TRF1 interacting protein 2*
TR- *Telomerase RNA*
TRBD- *Telomerase RNA-binding domain*
TRF- *Terminal restriction fragment*
TRF1- *Telomeric repeat binding factor 1*
TRF2- *Telomeric repeat binding factor 2*
TRF- *Telomeric restriction fragment*
WT1- *Wilm`s tumor suppressor*

I- Introdução

A palavra genética encontra a sua fundação na palavra grega “geno”, que significa “fazer nascer”, podendo, por isso, ser definida como a ciência que estuda os genes, a hereditariedade e a forma como estes transmitem as características biológicas de geração para geração.

Começando a ser verdadeiramente desenvolvida há cerca de 150 anos, a genética é ainda uma área científica que tem, ainda, muito conhecimento para oferecer. O marco histórico é atribuído à investigação do frade Gregor Johann Mendel, que foi publicada no ano de 1866 e que utilizou uma ervilha como modelo biológico para explorar a hereditariedade. Depois da “Herança Mendeliana”, muitos outros estudos de investigação sobre teorias da hereditariedade foram surgindo e, em 1900, os cientistas Hugo de Vries, Carl Correns e Erich von Tschermak, liderados por Thomas Hunt Morgan, desenvolveram os conceitos implícitos nos estudos conduzidos por Mendel sobre os padrões básicos da herança genética, os quais foram amplamente aceites pela comunidade científica no ano de 1925. A partir dessa altura, os estudos foram orientados para a investigação física do gene. Nas décadas de 40 e 50 do século XX, estudos conduzidos por diversos investigadores sugeriram que o DNA integrava o cromossoma, o qual continha os genes. Subsequentemente, o estudo de vírus e bactérias, e a descoberta da dupla hélice do DNA no ano de 1953, marcaram a viragem para a era da genética molecular. Nos anos seguintes, foram desenvolvidas técnicas para a sequenciação de proteínas e de ácidos nucleicos, e foi identificada a relação entre a informação contida em duas moléculas biológicas – ácidos nucleicos e proteínas – que tomou forma no conhecido código genético. Seguiram-se os estudos sobre a regulação da expressão genética, na década de 60, mas esta fase foi rapidamente ultrapassada pelas técnicas de engenharia genética na década de 70. Nas últimas décadas do século XX, grande parte dos cientistas direccionou a sua atenção para outros trabalhos de grande escala, tais como a sequenciação dos genomas. As implicações desses estudos para o conhecimento da biologia molecular e celular ainda hoje continuam a ser investigadas (Alberts *et al.*, 2010; Azevedo e Sunkel, 2012; Strachan e Read, 2012).

Tendo em conta esta perspectiva histórica, seria de esperar que os telómeros (do grego “telos”, que significa final, e do grego “meros” que quer dizer partes), que são estruturas

terminais dos cromossomas, tivessem sido identificados no início do século XX. De facto, foi na década de 30 do século XX que estas estruturas foram descritas pela primeira vez por Hermann Joseph Muller. Hoje sabe-se que são estruturas presentes nas células eucarióticas, constituídas por segmentos repetidos de DNA não codificante e proteínas e que têm como principal função manter a estabilidade do cromossoma, nomeadamente como protetores dos cromossomas, quer garantindo que a informação genética relevante seja copiada na perfeição quando a célula se replica, quer evitando a degradação, ou eventos de recombinação ou translocação robertsoniana (Kupiec, 2013; Sprouse *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Quando se dá a divisão de uma célula, os telómeros vão sendo ligeiramente encurtados, e, quando estes atingem o seu estado crítico, a célula perde a sua capacidade de reprodução, entrando em senescência. Em 1965, Leonard Hayflick fez a primeira observação de morte celular sem replicação. Como forma de homenagear o cientista, ao momento em que os telómeros alcançam o seu tamanho mínimo sem que, com isso, sejam causados problemas na divisão celular deu-se o nome de Limite de Hayflick. Essa observação não só foi consequente, como deu origem a uma linha de investigação que, presentemente, continua a ser ativamente explorada sob perspetivas diferentes mas complementares, o que ilustra bem a atualidade da investigação da relação entre os telómeros e o envelhecimento celular (Kupiec, 2013; Sprouse *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho foi elaborado com o objetivo de fornecer uma perspetiva global, integrada e atualizada sobre a estrutura e a função dos telómeros, e sobre o seu papel na problemática do envelhecimento celular. A metodologia utilizada para a elaboração deste trabalho consistiu numa revisão bibliográfica a partir do banco de dados PubMed. A partir das palavras-chave “human telomerase”, “telomere length” e “aging”, foram encontradas 219 e 361 publicações científicas reportadas, respetivamente, aos últimos 5 anos (2010-2014) e 10 anos (2005-2014). Dado o elevado número publicações registadas nos últimos anos, a consulta bibliográfica para a elaboração deste trabalho reportou-se essencialmente aos últimos 5 anos. O elevado número de trabalhos publicados traduz, naturalmente, o interesse e a atualidade do tema ao nível da comunidade científica e justifica, simultaneamente, o interesse da escolha do tema para o desenvolvimento do presente trabalho.

II- Desenvolvimento

Uma das características mais pertinentes de todos os organismos vivos é a sua capacidade de reprodução, através da qual transmitem à descendência as suas próprias características. O conjunto de características transmitidas pelos progenitores aos seus descendentes constitui a sua herança genética.

Nas primeira metade do século XX, foi estabelecido que tanto em eucariotas como em procariotas o DNA era a molécula responsável pela passagem das características genéticas entre gerações. Desde então, muitos foram os avanços registados ao nível do conhecimento neste domínio, uma grande parte dos quais produziu conhecimento consensual na comunidade científica. Por isso, para a elaboração da maioria da informação apresentada nas próximas secções deste capítulo (secções 1.1 a 1.3), foram essencialmente consultados livros da especialidade e/ou artigos de revisão (Alberts *et al.*, 2010; Azevedo e Sunkel, 2012; Strachan e Read, 2012) que coletivamente constituem as citações bibliográficas dessas secções.

1. Base cromossómica da hereditariedade

1.1. Estrutura da molécula de DNA

Uma molécula de DNA consiste em duas longas cadeias polinucleotídicas que se encontram unidas através de ligações de hidrogénio que se estabelecem entre bases nitrogenadas complementares desses nucleótidos (Figura 1). Os nucleótidos são formados por uma pentose (açúcar de cinco carbonos) que se associa a um ou mais grupos fosfato e a uma base nitrogenada. No caso dos nucleótidos do DNA, o açúcar é uma desoxirribose (da qual deriva o nome da molécula, i.e., ácido desoxirribonucleico) ligada a um único grupo fosfato, e quatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). A cadeia possui 2 extremidades, denominadas por extremidade 3' e extremidade 5'. As duas extremidades da cadeia são facilmente identificáveis através da presença do grupo hidroxilo e do grupo fosfato livres na posição 3' e 5' da molécula, respetivamente.

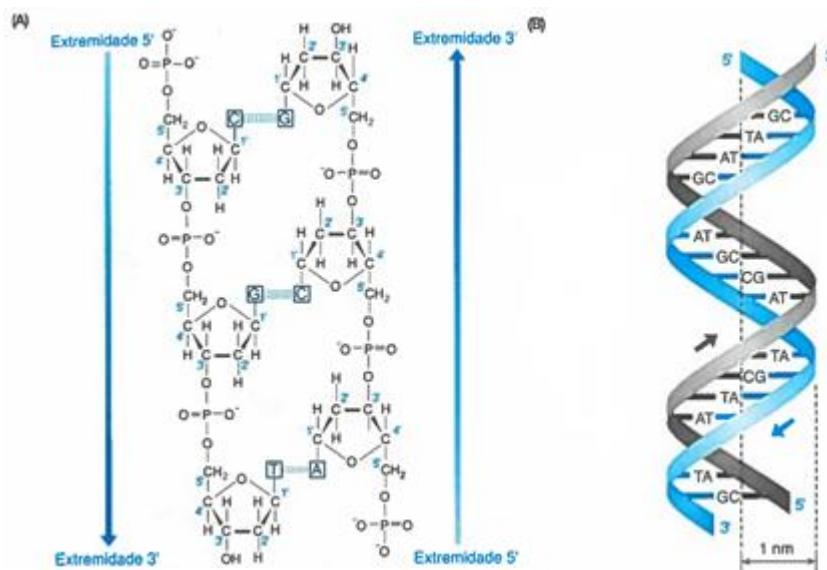


Figura 1- Estrutura da molécula de DNA. (A) Natureza antiparalela das duas cadeias do DNA; (B) Estrutura do DNA em dupla hélice (Figura extraída de Strachan e Read, 2012).

Tal como pode ser observado na Figura 1, as bases nitrogenadas estão voltadas para o interior da dupla-hélice e ligadas por pontes de hidrogênio, e o esqueleto de açúcar-fosfato encontra-se na região externa. As bases nitrogenadas citosina e timina são chamadas de pirimidinas, enquanto as bases adenina e guanina, são chamadas de purinas. Assim, uma base mais robusta, com dois anéis (uma purina), forma par com uma base com um anel único (uma pirimidina), resultando o pareamento A/T e C/G. Essa complementaridade de bases permite manter a estrutura de açúcar-fosfato equidistante ao longo da molécula de DNA. As duas cadeias polinucleotídicas enrolam-se para formar a dupla-hélice, maximizando deste modo a compactação do DNA. Os membros de cada par de bases somente se encaixam na dupla-hélice se as duas cadeias da hélice estiverem na posição antiparalela e verificando-se, subsequentemente, que a sequência de nucleótidos de uma das cadeias é complementar à sequência de nucleótidos da outra cadeia da molécula de DNA.

Este emparelhamento regular e complementar que ocorre, no modelo estrutural de dupla hélice, entre bases azotadas das duas cadeias de DNA sugeriu a Watson e Crick um mecanismo simples para a replicação desta molécula que consiste na utilização de uma das cadeias da molécula de DNA parental como molde para a síntese de uma nova cadeia que lhe fosse complementar, tendo como resultado a formação de uma dupla hélice em cada célula filha idêntica à dupla hélice parental.

1.2. Mecanismo básico da replicação do DNA

A replicação fiel da informação hereditária é um requisito essencial para a sobrevivência do indivíduo e da espécie. Trata-se, no entanto, de um processo complexo e dinâmico que envolve a formação de estruturas multiproteicas que se associam e dissociam sequencialmente da molécula de DNA. Durante o processo de síntese ou replicação da molécula de DNA, as duas cadeias complementares da dupla hélice são desenroladas por uma enzima, a helicase, e cada uma delas dirige a síntese de uma cadeia complementar resultando na formação de duas novas moléculas de DNA. Como cada nova molécula de DNA contém uma cadeia da molécula parental e outra recém-sintetizada a partir dessa cadeia da molécula parental que é usada como molde, diz-se que o processo de replicação é semiconservativo (Figura 2).

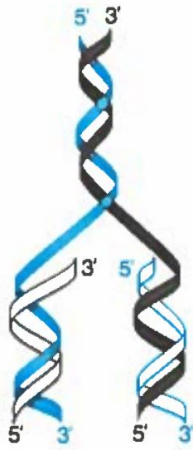


Figura 2- Replicação da molécula de DNA segundo o modelo semi-conservativo (Figura extraída de Strachan e Read, 2012).

A enzima chave do processo de replicação é a DNA polimerase que catalisa a incorporação, na cadeia nascente de DNA, de desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfato (dNTP) complementares aos existentes na cadeia do DNA usada como molde (cadeia parental). A manutenção da hereditariedade implica, igualmente, que a passagem da informação genética à descendência se faça sem erros, o que exige uma capacidade adequada de deteção e correção dos erros que possam ocorrer durante o processo de replicação do DNA. Por isso, este processo é complementado por mecanismos complexos de reparação que podem ocorrer durante e/ou após a replicação do DNA.

De um modo geral, a replicação do DNA inicia-se a partir de uma origem de replicação (Figura 3) que é reconhecida por uma proteína heteromérica específica (ORC – *Origin recognition complex*). A ligação de ORC ao DNA no local de iniciação da replicação é dependente de ATP, recruta outras proteínas (fatores de iniciação), nomeadamente helicases que promovem o desenrolamento da molécula de DNA, e conduz o movimento da maquinaria molecular da replicação em direções opostas da cadeia parental a partir da origem (Aladjem, 2007; Chesnokov, 2007). Em cada ponto de replicação forma-se uma estrutura em forma de Y (forquilha de replicação) que corresponde ao bifurcamento da cadeia dupla de DNA parental. O início da replicação do DNA, que ocorre na fase S do ciclo celular, dá-se em momentos diferentes nas diversas origens mas, eventualmente,

bolhas de replicação poderão fundir-se. A replicação é um processo demorado e no caso de células humanas em cultura ele dura cerca de oito horas.

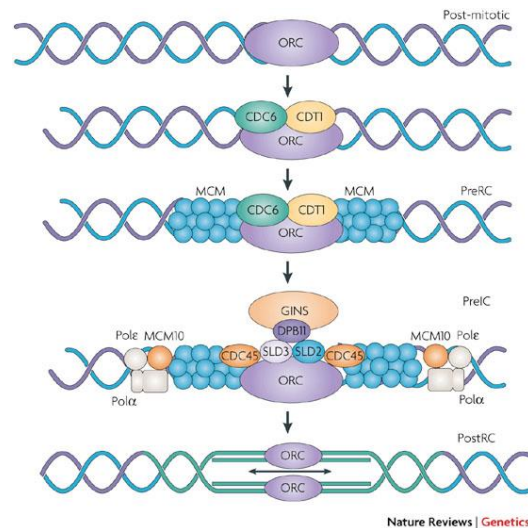


Figura 3- Formação do complexo pré-replicação. A figura ilustra o complexo que antecede processo de replicação bidirecional da cadeia linear de DNA numa célula eucariótica animal. De salientar a ligação de diversas proteínas a ORC que são essenciais para a condução do processo de replicação semi-conservativa em ambos os sentidos, contribuindo para seu dinamismo e complexidade (Figura extraída de Aladjem, 2007).

O mecanismo geral da replicação está ilustrado na Figura 4 e é a seguir descrito de forma sumária. Para aliviar a tensão de torção das cadeias de DNA pela helicase, atuam enzimas conhecidas por topoisomerases. Para iniciar a síntese de cada uma das novas cadeia, e devido à impossibilidade dela ser realizada diretamente a partir da ação de uma DNA polimerase, irá intervir o complexo enzimático da primase. Este complexo sintetiza um fragmento de RNA, designado por fragmento iniciador, RNA iniciador ou RNA *primer*, a partir da extremidade 5' de cada uma das novas cadeias a sintetizar. Esse fragmento proporciona o local de ligação da DNA polimerase à cadeia nascente, possibilitando a síntese da nova cadeia na direção de 5' para 3'. No entanto, devido ao antiparalelismo da cadeia de DNA parental e do mecanismo de replicação ser semi-conservativo, só uma delas poderá ser elaborada de modo contínuo a partir da região da cadeia parental

imediatamente adjacente à origem de replicação. Esta será a cadeia *leading*. Assim, a outra cadeia, a *lagging*, irá ser sintetizada na direção oposta ao avanço da forquilha de replicação, de forma descontínua, a partir de diversos fragmentos de RNA iniciador, colocados na maioria dos casos pela primase, e que são alongados pela DNA polimerase resultando na formação de fragmentos de Okazaki. Após a remoção do RNA iniciador, fragmentos de Okazaki posicionados adjacente são ligados pela DNA ligase (após a ação de uma outra DNA polimerase), que estabelece a ligação covalente final entre o grupo 3'-OH do último nucleótido do primeiro fragmento de Okazaki acabado de sintetizar e o grupo 5'-fosfato do fragmento de Okazaki seguinte, ao qual foi removido o RNA iniciador.

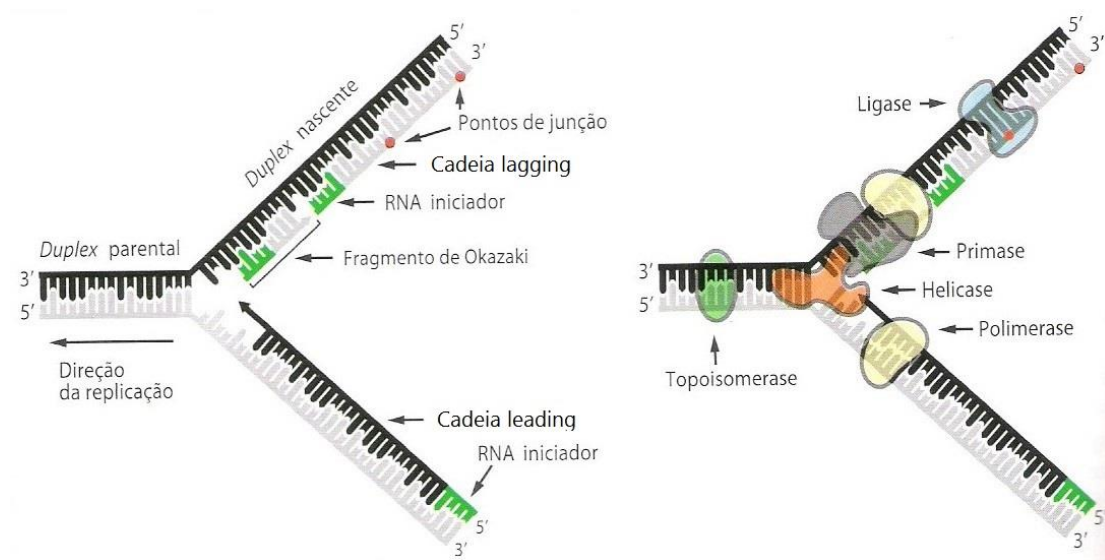


Figura 4- Representação esquemática da síntese das cadeias *leading* e *lagging* na zona da forquilha de replicação (Figura extraída de Azevedo e Sunkel, 2012).

1.3. Organização do DNA em cromossomas

Todos os organismos vivos utilizam o DNA como molécula transmissora da informação genética. No entanto, enquanto que o genoma dos organismos procarióticos é composto por uma única molécula de DNA de forma circular, o genoma dos organismos eucarióticos é formado por um ou vários cromossomas, sendo cada um deles constituído por uma molécula linear de DNA. O tamanho do genoma e o número de cromossomas varia entre diferentes espécies. Por exemplo, o genoma humano, com aproximadamente $3,2 \times 10^9$ nucleótidos, está distribuído por 23 pares de cromossomas diferentes. Cada cromossoma consiste numa única molécula linear de DNA com proteínas associadas que dobram e empacotam a molécula de DNA numa estrutura mais compacta.

A ideia de que o DNA é a molécula transmissora do material genético data do início do século XX, altura em que foi demonstrado que a molécula responsável pela hereditariedade é o DNA e não as proteínas, e foi consolidada em 1953 quando James Watson e Francis Crick publicaram os seu resultados relativos à estrutura do DNA. No entanto, hoje sabe-se que o mecanismo de regulação da estrutura do DNA e importantes aspetos da hereditariedade não dependem exclusivamente da molécula de DNA uma vez que necessitam da intervenção de proteínas. Ao conjunto formado pelo DNA e proteínas associadas, dá-se o nome de cromatina, ou seja, trata-se de uma mistura que contém, regula e transmite à descendência informação que é usada pela célula. A parte dessa informação hereditária que não se encontra codificada na molécula de DNA é representada pela epigenética.

Os cromossomas, para além de armazenarem e transportarem a informação genética, deverão ser fielmente distribuídos a todas as células de um organismo. Para tal, cada cromossoma tem de ser capaz de se duplicar e as duas cópias têm de ser separadas equitativamente pelas duas células filhas durante cada divisão celular (Figura 5). Para isso, a cromatina adota diferentes conformações ao longo do ciclo celular, como pode ser observado na Figura 5, a seguir apresentada.

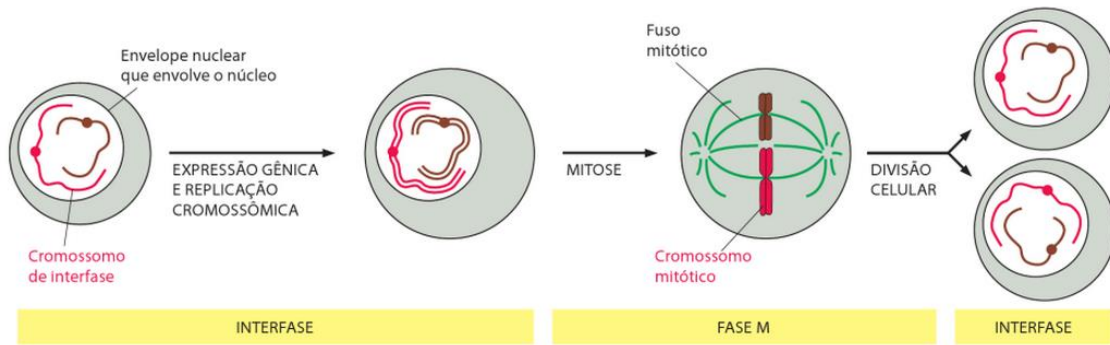


Figura 5- Visão simplificada do ciclo celular eucariótico (Figura extraída de Alberts *et al.*, 2010).

Durante a interfase, a cromatina apresenta-se com uma aparência mais difusa e encontra-se dispersa por toda a região nuclear. Quando as células não estão em divisão, cada cromossoma corresponde a uma longa molécula linear de DNA. Na forma descondensada, a totalidade de DNA de uma célula humana assume o aspeto de um fio muito fino com cerca de dois metros de comprimento (cada cromossoma contém em média cerca de cinco centímetros de DNA). No entanto, o genoma humano está contido dentro do núcleo cujo diâmetro é de 5 a 10 micrómetros. O DNA tem, portanto, de ser sujeito a uma compactação que se desenvolve a partir da fibra de DNA associada a proteínas, i.e., a cromatina (Figura 6).

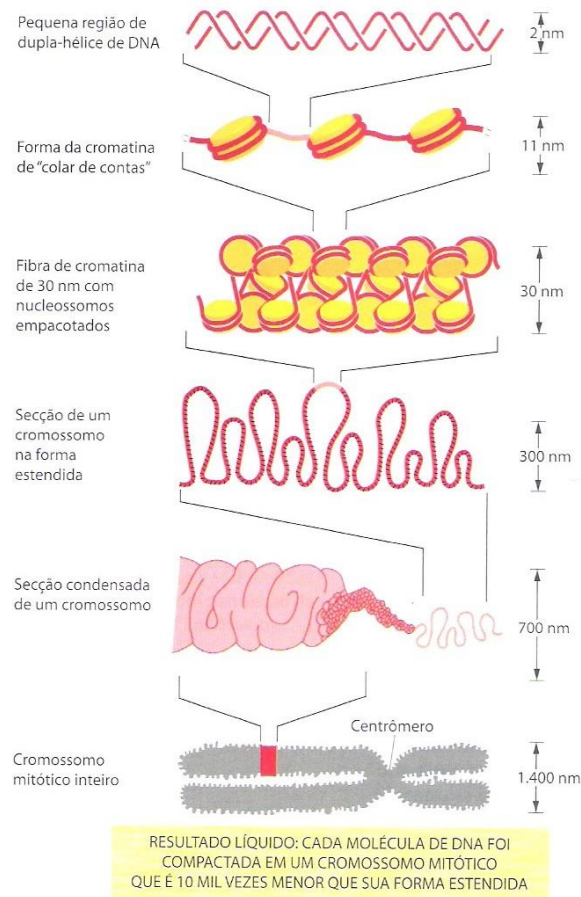


Figura 6- Compactação da cromatina. (Figura extraída de Alberts *et al.*, 2010)

As proteínas que se ligam ao DNA para formar o cromossoma eucariótico são, tradicionalmente, divididas em duas classes gerais, as histonas e as proteínas não histônicas. O complexo formado por essas duas classes de proteínas e pelo DNA nuclear eucariótico é conhecido como cromatina. As histonas estão presentes em enorme quantidade nas células, sendo que a sua massa total na cromatina é praticamente igual à do DNA. Estas são responsáveis pelo primeiro e mais básico nível de organização cromossômica, um complexo de DNA-proteína designado por nucleossoma e que foi descoberto em 1974. Cada nucleossoma contém um octâmero proteico composto por duas cópias de cada uma das quatro histonas H2A, H2B, H3 e H4. As histonas são pequenas proteínas altamente conservadas que, devido à sua elevada percentagem de aminoácidos básicos (arginina e lisina), facilitam a neutralização do DNA, que tem carga negativa, e desta forma tornam o complexo DNA-proteína estável. O octâmero proteico de histonas

assume uma forma de disco em torno do qual 146 pares de bases da dupla hélice de DNA dão 1.65 voltas. Ao nucleossoma junta-se ainda uma histona de ligação (H1) que organiza mais 20 pares de bases de forma a completar e estabilizar o nucleossoma, denominando-se, então, cromatossoma. Sendo assim, cada cromatossoma é composto por 166 pares de bases de DNA, que se enrolam à volta de um núcleo proteico de histonas e é estabilizado por uma molécula de histona H1.

O empacotamento à volta dos nucleossomas dá origem a uma fibra com cerca de 11 nm de diâmetro composta por cromatossomas separados por segmentos de DNA de ligação de comprimento variável. Quando a cromatina nuclear é isolada e visualizada por microscopia eletrónica, deteta-se uma estrutura mais larga do que 11 nm, com cerca de 30 nm de diâmetro. Contudo, este enrolamento do DNA em fibras de 30 nm não é suficiente para compactar o DNA dentro do núcleo. Por isso, níveis maiores de compactação podem ser observados mesmo em interfase. No entanto, apesar de vários estudos, pouco se sabe acerca dos mecanismos que promovem a formação de níveis de condensação mais elevados, muito provavelmente pelas limitações experimentais impostas pela própria natureza da cromatina interfásica.

Todas as alterações na estrutura da cromatina são processos dinâmicos e altamente regulados. Mesmo em interfase, diferentes regiões nucleares apresentam diferentes graus de compactação de modo a que a cromatina possa servir duas funções potencialmente opostas. Se, por um lado, a cromatina promove o empacotamento do DNA de modo a condensar esta macromolécula dentro do reduzido volume nuclear, por outro lado, tem de permitir que o DNA esteja acessível para os mais variados processos em que participa (síntese do RNA mensageiro, replicação do DNA, reparação do DNA, etc.)

Quando as células se preparam para a divisão, duplicam o seu material genético. Quando se inicia o processo de divisão nuclear ou mitose, a estrutura difusa da cromatina interfásica é convertida na sua forma mais condensada, o cromossoma mitótico. Na metafase, o cromossoma mitótico adota uma forma em X, facilmente identificável por microscopia, e que é representativa de duas moléculas de DNA geneticamente idênticas. Por isso, os cromossomas mitóticos são comumente analisados por cariotipagem que é um procedimento laboratorial que permite visualizar e identificar cada cromossoma de uma célula e que constitui, por isso, um método de diagnóstico extremamente útil para a

identificação/exclusão de várias doenças causadas por alterações cromossômicas, sejam elas estruturais ou numéricas.

O cromossoma atua como uma unidade estrutural distinta. Para que uma cópia possa ser transmitida a cada célula-filha durante a divisão, cada cromossoma tem de ser previamente duplicado, e a nova cópia deve ser, subsequentemente, separada e dividida corretamente entre as duas células-filhas. Essas funções básicas são controladas por três tipos de sequências nucleotídicas especializadas no DNA (Figura 7), às quais se ligam proteínas específicas que direcionam a maquinaria que replica e segrega os cromossomas.

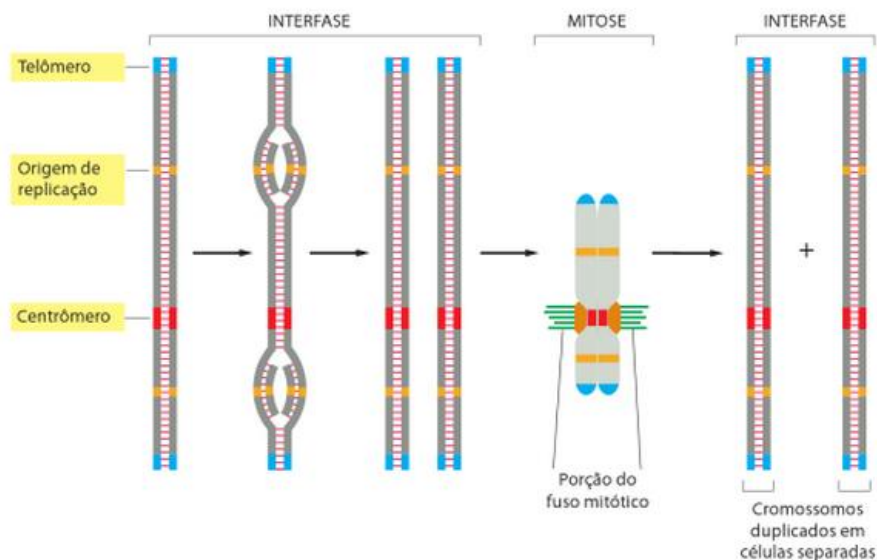


Figura 7- Sequências de DNA de um cromossoma eucariótico funcional. Essas sequências incluem o centrômero, a origem de replicação e o telômero (Figura extraída de Alberts *et al.*, 2010).

Cada cromossoma tem diversas origens de replicação, um centrômero e dois telômeros. O centrômero permite que uma cópia de cada cromossoma duplicado e condensado seja levada para cada célula-filha no momento da divisão celular. A composição e a função dos telômeros (extremidades dos cromossomas) é a seguir apresentada.

2. Estrutura e função dos telómeros

A descoberta dos telómeros data do início do século XX, mais precisamente da década de 1930. Em virtude dos numerosos trabalhos publicados sobre este tema, apenas a informação relevante para a compreensão do presente trabalho é a seguir apresentada.

2.1. DNA telomérico e proteínas associadas

Os telómeros são estruturas nucleoproteicas de comprimento variável, geralmente formados por heterocromatina, e constituídas por longas extensões de repetições hexaméricas 5'-TTAGGG-3' de cadeia dupla e por um complexo proteico específico designado por *shelterin*. No caso dos telómeros humanos, o seu comprimento pode variar entre 9 e 15 Kb (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Ao nível do telómero, a ação de exonucleases origina a formação de estruturas repetidas de cadeia simples, i.e., saliências ricas em guaninas na extremidade 3', que se dobram para trás sobre si mesmas ao longo da cadeia dupla de DNA conduzindo à formação de um laço (*T-Loop*) com o auxílio de TRF2 (*Telomeric repeat binding factor 2*). Os *T-Loops* representam uma capa protetora contra a ação da maquinaria molecular de vigilância e reparação de danos no DNA. A formação destas estruturas também veda o acesso de proteínas às extremidades dos telómeros, impedindo a fusão de extremidades teloméricas e protegendo, desta forma, os cromossomas. (Armanios e Blackburn, 2012; Kong, Lee e Wang, 2012; Kupiec, 2013; Wang *et al.*, 2015).

O complexo proteico que se liga às sequências de DNA telomérico é constituído por seis proteínas: TRF1 (*Telomeric repeat binding factor 1*), TRF2, RAP1 (*Repressor/activator protein 1*), TIN2 (*TRF1 interacting protein 2*), TINT1/PIP1/PTOP1 (TTP1- também designado por *POT1-interacting protein*) e POT1 (*Protection of telomeres protein 1*) (Figura 8). A sua função consiste em proteger as extremidades dos cromossomas contra uma eventual fusão e/ou o reconhecimento erróneo da existência de uma quebra na cadeia dupla de DNA e subsequente processamento e degradação prematura, com perda associada de informação genética, bem como regular a síntese de DNA telomérico e regular/manter o comprimento do telómero (Kong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). As

proteínas TRF1 e TRF2 interatuam com a cadeia dupla de DNA telomérico, POT1 e TTP1 interatuam com a região de cadeia simples, TRF2 liga-se a RAP1, proteínas de ligação a segmentos de DNA de cadeia simples ou dupla interatuam entre si via TIN2 que, por sua vez, interatua com as proteínas TRF1, TRF2 e TPP1 (Maicher *et al.*, 2012; Zvereva *et al.*, 2010).

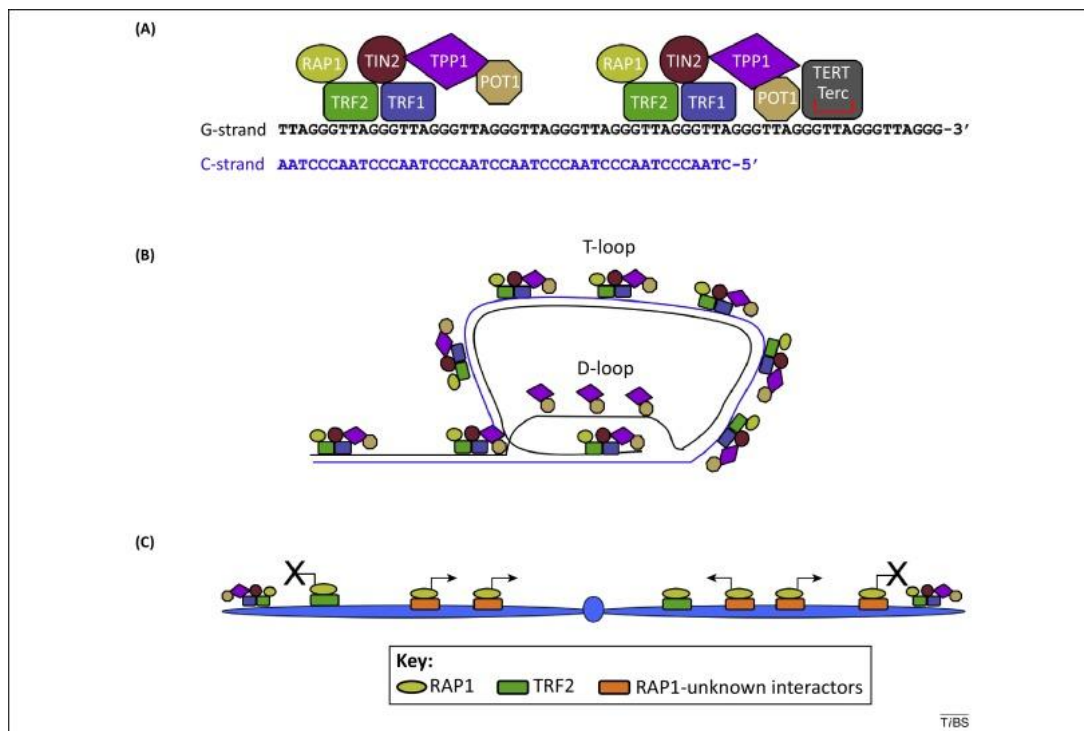


Figura 8 – Estrutura do complexo telómero/*shelterin*. (A) Representação esquemática das proteínas de ligação ao telómero, do complexo shelterin e da telomerase. O complexo shelterin compreende TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1. TRF1, TRF2, e POT1 ligam-se diretamente às repetições do DNA telomérico, enquanto TRF1 e TRF2 ligam-se à cadeia upla do DNA telomérico e POT1 à saliência da extremidade G da 3' ssDNA. TIN2 liga TRF1 e TRF2 através de outros domínios e recruta o complexo TPP1-POT1. TPP1 recruta a telomerase para os telómeros. Esta enzima possui uma subunidade catalítica (TERT – *Telomerase reverse transcriptase*) e uma cadeia de RNA (Terc – *Telomerase RNA component*) que atua como molde na replicação do DNA telomérico ao reconhecer a saliência da extremidade 3'-OH da cadeia G promovendo a sua elongação. (B) Modelo esquemático da ligação do complexo de shelterin ao telómero na configuração de laço telomérico (T-loop). Os telómeros contém uma região de cadeia dupla de DNA constituída por repetições TTAGGG e um segmento de cadeia simples de DNA de 30–400 nucleótidos que forma uma saliência na cadeia rica em

G (*G-strand*). Essa saliência da cadeia G (a preto) invade a região dsDNA do telómero para formar um laço protetor (*T loop*) com o deslocamento do laço D (*Displacement-D-loop*) nesse local. (C) RAP1 liga-se à cromatina telomérica e à cromatina não-telomérica. Nos telómeros, a ligação de RAP1 ocorre através da interação com TRF2. Nos locais não-teloméricos que exibem repetições da sequência ATTGGG, a ligação de RAP1 também deverá ocorrer via interação com TRF2, enquanto que nos locais que não possuem essas repetições a interação deverá ocorrer através de outras proteínas ainda não identificadas. RAP1 exerce função reguladora ao nível transcricional. Em regiões subteloméricas, RAP1 está envolvida no seu silenciamento. (Figura extraída de Martínez e Blasco, 2015)

2.2. TERRA: RNA telomérico não codificante

Até recentemente, os telómeros eram considerados segmentos transcricionalmente silenciosos. Porém, em 2007, foi demonstrado por Azzalin e colaboradores que os telómeros de mamíferos são transcritos em moléculas de RNA constituídos por repetições teloméricas (TERRA, *Telomeric repeat-containing RNA*). TERRA é produzido pela ação da RNA polimerase II (RNAPII) a partir de vários *loci* subteloméricos que estão localizados próximo das extremidades dos cromossomas e é constituído por repetições da sequência UUAGGG, em número variável. Nos mamíferos, essas repetições podem atingir um comprimento que varia entre 100 bp a 9 Kb. TERRA é evolutivamente conservada, tendo sido observada desde células de leveduras até células humanas. TERRA é expresso na maioria dos tecidos humanos e cerca de 7% das moléculas produzidas são poliadeniladas na extremidade 3', enquanto que a totalidade das moléculas possui 7-metilguanossina na extremidade 5' Cap. Essas modificações aumentam a estabilidade das moléculas TERRA. Para além disso, TERRA forma G-quadruplexes estáveis *in vitro* e *in vivo* em virtude da elevada proporção em guanina, ligando-se à proteína telomérica TRF2 através da formação dessa estrutura intermolecular. Recentemente, foram identificadas novas proteínas que interagem com o RNA não codificante repetitivo e que desempenham função ao nível da sua associação com telómeros, sugerindo que a maquinaria molecular envolvida na homeostasia telomérica não está, ainda, completamente elucidada (Wang *et al.*, 2015).

A associação de TERRA com os telómeros ocorre através da formação de um segmento híbrido RNA-DNA ou da interação de ribonucleoproteínas (Wang *et al.*, 2015). Aspectos da biogénese de TERRA e da sua associação e dissociação aos telómeros são ilustrados na Figura 9.

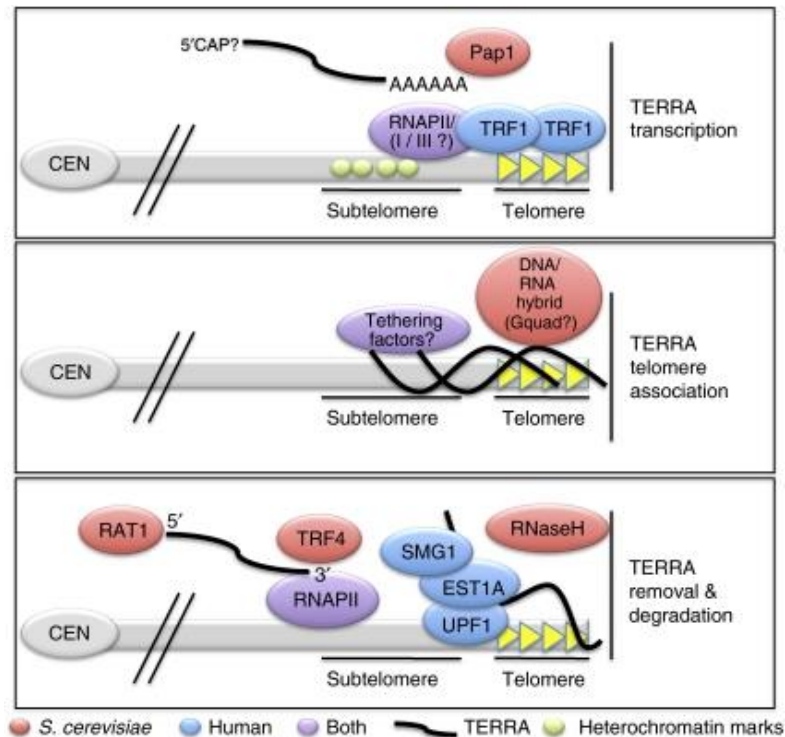


Figura 9 – Biogénese, associação e dissociação de TERRA. Biogénese de TERRA (Painel superior). TERRA é um transcrito produzido pela RNA Polimerase II a partir de sequências subteloméricas e na direção do telómero e, em células humanas, requer a interação da enzima com TRF1. A molécula TERRA produzida é poliadenilada através da ação da poli(A) polimerase (Pap1) e modificada na extremidade 5' com a estrutura Cap. Associação de TERRA ao telómeros (Painel intermédio). Estudos de RNA-FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) mostraram co-localização de TERRA com os telómeros em cromossomas humanos em interfase e metafase. Adicionalmente, várias evidências sugerem que pelo menos uma porção de TERRA está ligado a regiões de DNA telomérico via emparelhamento de bases complementares. Interações RNA-proteína e/ou estruturas intermoleculares do tipo G-quadruplexes também contribuem para a ligação de TERRA ao DNA telomérico. Dissociação e degradação de TERRA (painel inferior). A exonuclease 5'→3' Rat1 encontra-se associada ao telómero e promove a degradação de TERRA, eventualmente de forma co-transcricional. Outros fatores tais como a poli(A)-polimerase ou TRF4 (em leveduras) também contribuem para a degradação de TERRA,

embora de forma menos expressiva do que Rat1. Fatores proteicos associados a NMD (*Nonsense-mediated RNA decay*) tais como UPF1, SMG1 and EST1A/SMG6 contribuem para a dissociação de TERRA. A sobreexpressão de RNaseH contribui para a redução do nível intracelular de TERRA no caso de Rat1 não estar disponível ou funcional (Figura extraída de Luke e Lingner, 2009). De notar que as situações assinaladas pelos autores, em 2009, como eventuais (?), estão atualmente comprovadas experimentalmente.

TERRA é um fator crítico da regulação do comprimento dos telómeros uma vez que promove o encurtamento dos telómeros através da inibição da atividade da telomerase, ativação de reações dependentes da exonuclease 1, aumento do nível de eucromatina e diminuição do nível de heterocromatina. Porém, existem algumas evidências de que TERRA também pode atuar como um fator protetor, pelo que é provável que o nível global de TERRA seja rigorosamente controlado durante todas as fases do ciclo celular para evitar alterações indesejadas no comprimento dos telómeros (Wang *et al.*, 2015).

2.3. Métodos de análise do comprimento dos telómeros

Os telómeros perdem a sua função quando o comprimento do DNA telomérico é inferior ao limite crítico e/ou ocorre perda de ligação, total ou parcial, ao complexo *shelterin* (Pickett e Reddel, 2012).

Várias técnicas têm sido aplicadas na determinação do comprimento dos telómeros, nomeadamente, a técnica tradicional TRF (*Terminal restriction fragment*) associada ao *Southern-blot*, análise por *slot-blot*, PCR (*Polymerase chain reaction*) a tempo real e FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) quantitativo (Figura 10) (Turner *et al.*, 2014).

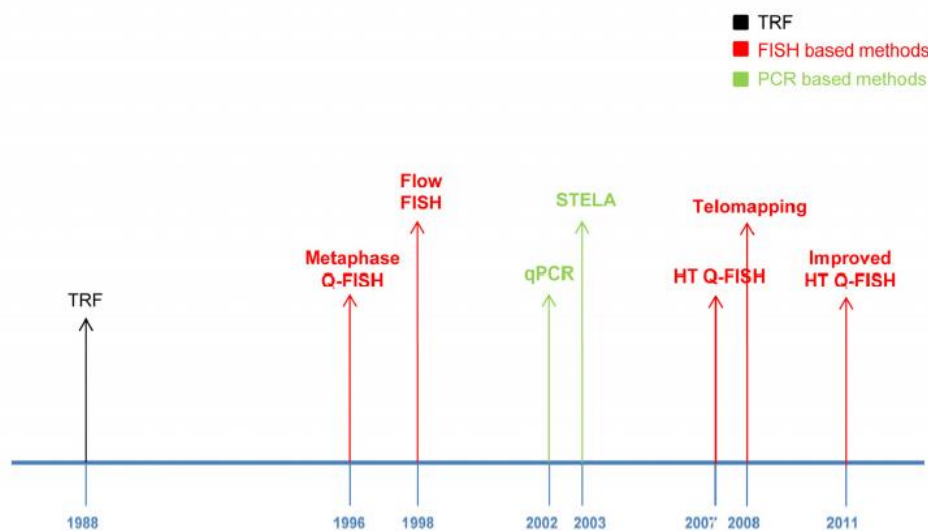


Figura 10 - Cronograma dos principais métodos de medição do comprimento dos telómeros (Figura extraída de Vera e Blasco, 2012).

Os estudos de determinação do comprimento dos telómeros começaram por volta de 1980, utilizando a metodologia TRF-*Southern blot*, que consiste na hibridação da sonda radioativa P^{32} -(TTAGGG)_n a fragmentos de DNA genómico resultantes da digestão com as enzimas de restrição Hinf/Rsa I e transferidos para uma membrana de nylon, com subsequente exposição a um filme autoradiográfico (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012). A análise por TRF é, ainda hoje, a metodologia mais utilizada para medir o comprimento médio dos telómeros. Este método apresenta como vantagens o facto de ser uma técnica bem conhecida e amplamente utilizada, não apresentar necessidades especiais em termos de reagentes nem requerer grande experiência ou equipamentos complexos. Contudo, tem como desvantagem o facto da quantificação do tamanho dos telómeros depender da resolução dos fragmentos de restrição, a qual pode ser dificultada por digestão incompleta do DNA que, a ocorrer, origina a sobrestimação do comprimento dos telómeros, ou pela contribuição de sequências não teloméricas adjacentes ao telómero mas a jusante do sítio de restrição, ou ainda pela existência de regiões hipervariáveis que dão origem a polimorfismos subteloéricos (Figura 11) (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012).

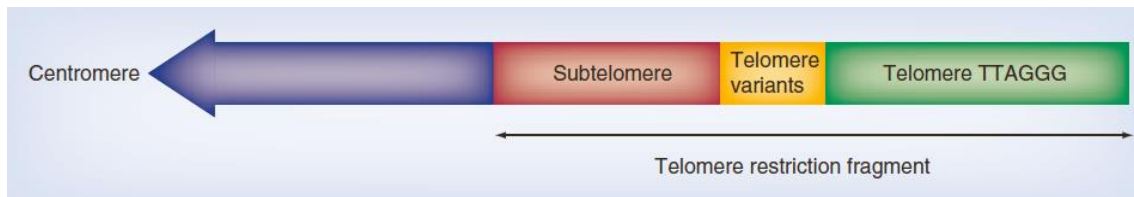


Figura 11 - Região terminal dos braços do cromossoma. Os fragmentos de restrição dos telómeros podem conter, para além das verdadeiras sequências teloméricas repetidas de TTAGGG, sequências variantes das sequências de repetição dos telómeros e sequências subteloméricas (Figura extraída de Turner *et al.*, 2014).

A fim de resolver algumas das limitações intrínsecas do método baseado em TRF, foi proposta uma versão mais simplificada em 1997, a análise por *slot-blot* (ou *dot-blot*), para a determinação da razão centrómero/telómero. Apesar deste ensaio poder analisar quantidades reduzidas de amostra, produz resultados muito variáveis não apresentando, por isso, uma sensibilidade adequada (Turner *et al.*, 2014).

A técnica Q-FISH (*Quantitative fluorescence in situ hybridization*) é uma adaptação da técnica citogenética padrão, FISH, desenvolvida na década de 1980 (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012). Este procedimento baseia-se na utilização de microscopia de fluorescência digital para a determinação do comprimento do telómero em células em metafase através da hibridação com uma sonda telomérica sintética (oligómero PNA – *peptide nucleic acid* – desenvolvido em 1991) marcada com um fluorocromo. Ele apresenta como vantagens o facto de permitir a medição do comprimento do telómero na extremidade de cada cromossoma e de ser um método de alta precisão. Uma das principais desvantagens desta técnica é o facto de necessitar de uma quantidade significativa de DNA (2-20 µg), ser muito dispendiosa, necessitar de equipamento altamente especializado e tratar-se de um método muito laborioso que exige experiência ao nível do processamento e da análise da imagem (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012). No sentido de ultrapassar as limitações desta técnica, foram adaptados outros procedimentos, nomeadamente *Flow-FISH* e PCR a tempo real.

O *Flow-FISH* é uma técnica citogenética usada para quantificar o número de elementos repetitivos que estão presentes no DNA genómico de uma população de células através da combinação da técnica de citometria de fluxo com protocolos de FISH, utilizando

células em interfase. Este método semi-automático é presentemente muito utilizado como ferramenta de diagnóstico clínico para a quantificação do comprimento dos telómeros em leucócitos do sangue periférico e permite a medição do comprimento do telómero na extremidade de cada cromossoma (Turner *et al.*, 2014).

O PCR em tempo real é outra das técnicas vulgarmente utilizadas para a quantificação do número de cópias de uma sequência de interesse. Em 2002, este procedimento foi adaptado para a análise do comprimento dos telómeros através da análise comparativa do valor da razão T (telómero) / S (gene de cópia única) obtida no DNA da amostra e no DNA de referência a fim de obter proporções relativas de T/S que são proporcionais ao comprimento médio dos telómeros existentes numa célula. A análise por PCR a tempo real é capaz de produzir resultados rápidos, exatos e fiáveis a partir de uma pequena quantidade de amostra. Pelo facto da sequência do telómero ser reconhecida por um *primer*, apenas sequências teloméricas são, em princípio, detetadas excluindo-se, deste modo, a interferência por parte de sequências não teloméricas. Como desvantagens, este método não permite quantificar o comprimento do telómero de cada cromossoma mas apenas o comprimento médio dos telómeros e, em alguns casos, pode requerer optimização substancial e conhecimento altamente especializado e diferenciado (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012).

Uma outra técnica baseada em PCR, STELA (*Single telomere elongation length analysis*), foi desenvolvida para a determinação do comprimento do telómero de cada cromossoma. Contudo, apresenta a limitação de amplificação de telómeros com um comprimento superior a 25-Kb (Turner *et al.*, 2014)

Em conclusão, estes métodos de medição dos telómeros têm evoluído a partir da análise de uma população de células (TRF) para a análise de células individuais (método FISH) e no sentido de uma maior automatização, rapidez e rendimento (*Flow FISH* e *HT Q-FISH - High-throughput Q-FISH*). A quantificação dos sinais das extremidades livres dos cromossomas ainda não pode ser efetuada por métodos HT uma vez que não é prático trabalhar com metafases em plataformas de alto rendimento. No entanto, como por HT Q-FISH é possível aumentar milhares de vezes o número de núcleos analisados, a aparente desvantagem é compensada pela possibilidade de análise e discriminação estatística (Aubert *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012).

3. Telomerase humana

O facto da maquinaria da replicação do DNA de uma célula não ser capaz de realizar a replicação completa das extremidades dos cromossomas e os telómeros poderem estar sujeitos à ação de nucleases, pode originar o encurtamento dos cromossomas em cada divisão celular e, eventualmente, conduzir a senescência e morte celular (Kupiec 2013; Zvereva, *et al.*, 2010). No entanto, na maioria dos organismos, este problema é resolvido através da adição de repetições de DNA telomérico por ação da telomerase que proporciona uma molécula molde para a produção dessa sequência de DNA telomérico em falta. Esta enzima foi descoberta em 1973 e promove a elongação a partir da extremidade 3' do cromossoma, enquanto que a sequência da cadeia complementar é completada por ação da DNA polimerase. (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012; Kupiec, 2013).

Em virtude dos numerosos trabalhos publicados sobre este tema, apenas a informação relevante para a compreensão do presente trabalho é a seguir apresentada.

3.1. Estrutura da enzima e domínios funcionais

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico frequentemente designado por RNA telomerase (TER, *Telomerase RNA*). A parte central da enzima inclui a subunidade catalítica, com atividade de transcriptase reserva (TERT, *Telomerase reverse transcriptase*), e RNA (TR – *Telomerase RNA*, *TER-Telomerase RNA* ou *TERC – Telomerase RNA component*), que representa a sequência molde para a elongação do DNA telomérico.

TERT possui sequências de aminoácidos semelhantes a outras transcriptases reversas, as quais são responsáveis pela ação catalítica, ligação ao DNA e reconhecimento de nucleótidos. A diferença estrutural relativamente a outras transcriptases reversas reside no local IFD (Figura 12) localizado entre os motivos conservados A e B das transcriptases reversas (Hukezalie e Wong, 2013; Zvereva *et al.*, 2010). Desde a descoberta da TERT

como um polipéptido com atividade de transcritase reversa no final da década de 90, vários trabalhos identificaram e caracterizaram mais de 40 proteínas TERT em eucariotas que, na sua maioria, partilham o mesmo tipo de organização estrutural (Hukezalie e Wong, 2013).

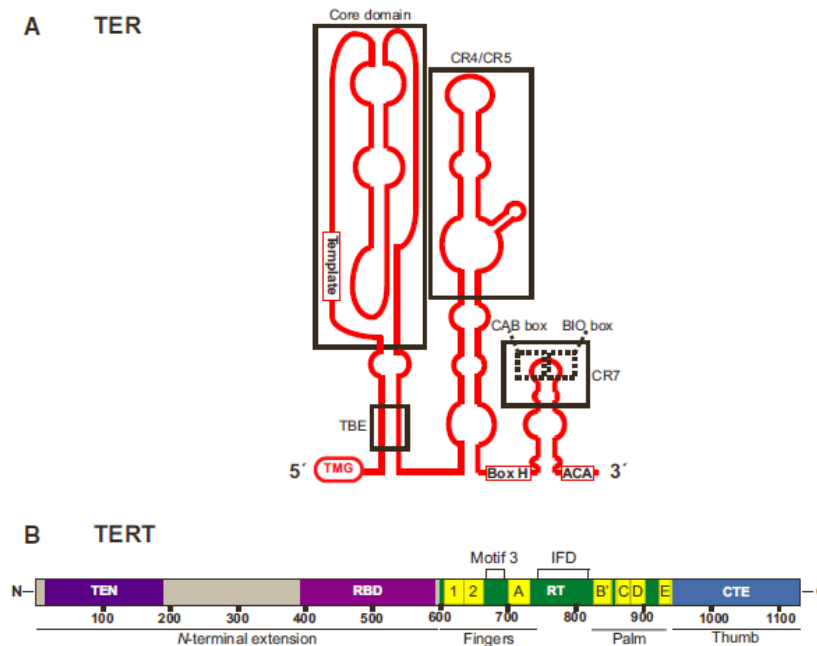


Figura 12 – Estrutura dos domínios da telomerase humana. (A) Estrutura secundária que descreve os vários domínios funcionais de TER. (B) Estrutura do domínio TERT (Figura extraída de Hukezalie e Wong, 2013).

A TER madura é uma pequena molécula de RNA de 451 nucleótidos (Figura 12A). As principais características estruturais incluem o domínio central, regiões conservadas 4 e 5 (CR4/CR5, ou STE), TBE (*template boundary element*) e o domínio constituído pelas caixas H/ACA que contém a região conservada 7 (CR7). TER efetua 2 contactos independentes com TERT, através do domínio central e do domínio CR4/CR5. Estes dois domínios conjuntamente com TERT constituem os requisitos mínimos para reconstituir a atividade de telomerase *in vitro*. O domínio H/ACA (nucleótidos 271-451) é essencial para a estabilidade celular de TER através da produção de uma ribonucleoproteína (RNP)

que contém um heterotrímero central constituído por disquerina, Nhp2 e Nop10, e um quarto fator, Gar1. Este complexo proteico é essencial para a biogénese e associação TERT/TERT e são componentes obrigatórios da RT durante todo o ciclo catalítico. Conforme pode ser observado na Figura 12B, TERT possui três domínios: extensão N-terminal, domínio RT e extensão C-terminal (CTE) (Hukezalie e Wong, 2013).

O domínio N-terminal de TERT compreende aproximadamente 400 aminoácidos e pode ser dividido em 2 domínios funcionais: domínio N-terminal essencial da telomerase (TEN, *telomerase essencial N-terminal*) e domínio da telomerase de ligação ao RNA (TRBD, *telomerase RNA-binding domain*). Nas células humanas, a região do TRBD de TERT desempenha uma função catalítica importante e independente da sua função de ligação ao RNA, por exemplo, ao nível da regulação da velocidade de biossíntese do DNA, enquanto que o domínio TEN possui uma região que é essencialmente responsável pela associação e estabilidade da ligação com a cadeia simples de DNA - atua como molde durante a reação catalítica - e domínios com outras funções, nomeadamente ao nível do posicionamento correto da enzima no local catalítico do DNA telomérico (Hukezalie e Wong, 2013). A deleção deste domínio suprime a atividade de telomerase *in vitro*. Esta observação não só sublinha a importância do domínio TEN para a atividade da enzima como está de acordo com a noção de que este domínio desempenha múltiplas funções que não são compensadas por outros domínios da enzima (Hukezalie e Wong, 2013).

O domínio RT de TERT corresponde ao centro catalítico da telomerase e possui vários motivos conservados. Este domínio está organizado em dois subdomínios, a região que interatua com o substrato - motivos 1 a A (*fingers*) e a região catalítica - motivos B a E (*palm*). Adicionalmente, o domínio RT também contém o domínio IFD (*insertion in fingers domain*) que é específico das TERTs e está implicado na estabilização das interações proteína-proteína ao nível da TERT. Uma das características diferenciais do domínio RT é a existência da tríade de resíduos de ácido aspártico entre os motivos A e C com importância crucial para a atividade de polimerase da telomerase. Mutações em resíduos conservados do domínio RT originam a perda total ou parcial da atividade da enzima *in vitro* (Hukezalie e Wong, 2013).

Relativamente ao domínio CTE, a proporção de resíduos conservados entre TERTs é reduzida. Esta observação sugere que as funções desempenhadas por este domínio deverão ser específicas da espécie. Apesar disso, mutações no terminal-C da TERT

humana afetam a atividade enzimática, a manutenção do comprimento do telómero e a localização subcelular (Hukezalie e Wong, 2013).

Os componentes TER e TERT da enzima são suficientes para a atividade da telomerase *in vitro*. *In vivo*, o complexo possui outros componentes proteicos essenciais para a ação da telomerase, nomeadamente para a ligação da telomerase ao telómero em fases específicas do ciclo celular, regulação da atividade da telomerase e maturação ou degradação de componentes deste complexo. No que respeita à interação de TER com o DNA, o comprimento da cadeia nucleotídica molde de TER é, frequentemente, igual ou próximo do comprimento de uma cópia e meia da repetição telomérica. A sequência molde de TER e as extremidades que definem o seu comprimento são determinadas pela estrutura secundária que TER assume; na extremidade 3' dessa região encontra-se o local de ligação ao *primer*, enquanto que na extremidade 5' existe um elemento ligado que separa a sequência molde do resto da molécula e que atua como local de reconhecimento da subunidade catalítica de TERT. Assim, TERT é responsável pela síntese das sequências repetitivas de DNA telomérico e pela manutenção do comprimento dos telómeros (Hukezalie e Wong, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Zvereva *et al.*, 2010).

3.2. Biossíntese e maturação

A biogénese da telomerase (Figura 13) inicia-se com a ligação co-transcricional da telomerase de RNA nascente ao heterotrímero central do domínio H/ACA. Este trímero também liga NAF1, que reconhece e liga o domínio C-terminal da RNA polimerase II e fatores de transcrição específicos, promovendo a ligação do complexo proteico H/ACA aos transcriptos nascentes de TER. A formação deste complexo ribonucleoproteico impede a degradação de TER por ação de exonucleases. Durante o processo de maturação do complexo TER-RNP, NAF1 é substituído por Gar1, e TER-H/ACA RNP é transportado através do nucléolo sendo, subseqüentemente, translocado até aos corpos de Cajal por recrutamento da proteína TCAB1. A ativação da telomerase é regulada ao nível transcripcional pelo nível de expressão mRNA/TERT. O polipéptido TERT é produzido em ribossomas citoplasmáticos, importado para o núcleo através do complexo do poro nuclear na presença dos chaperones HSP90 e p23 e transportado até ao nucléolo onde

reside temporariamente antes da associação a TER para formar a telomerase madura e ativa (Hukezalie e Wong, 2013).

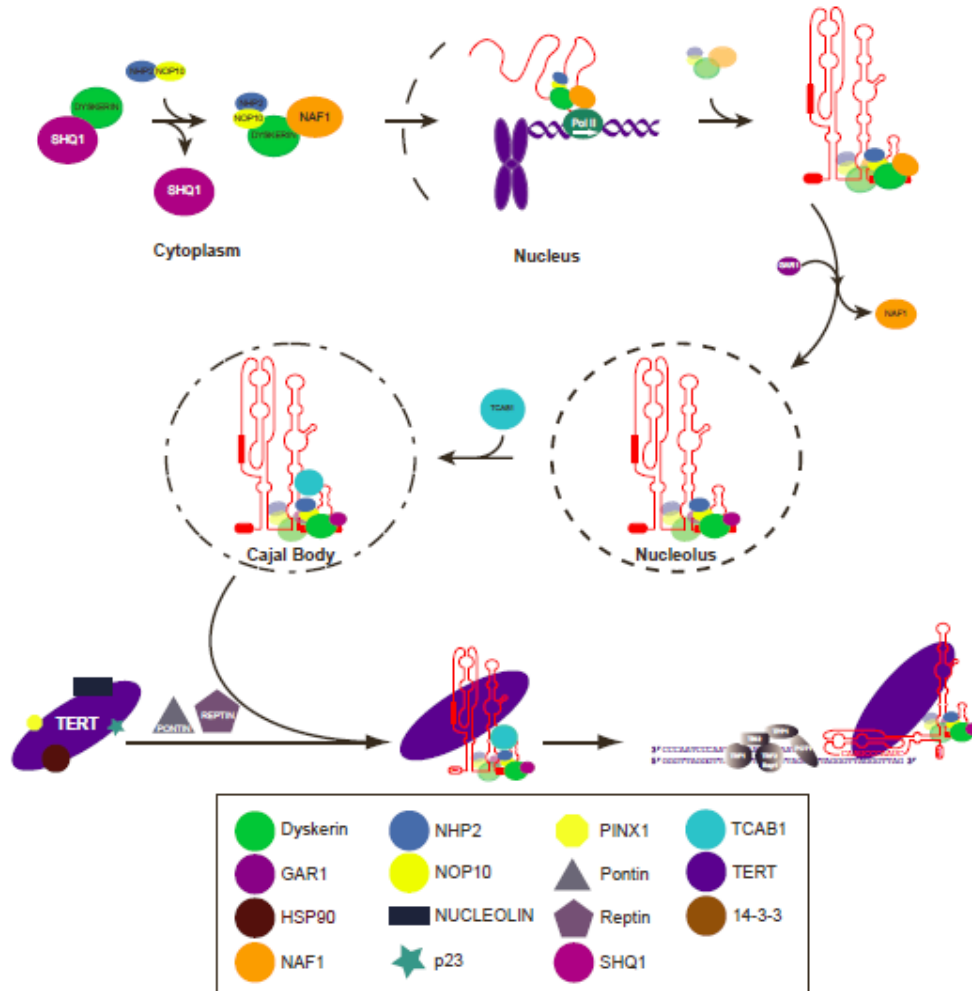


Figura 13- Biogênese e produção da telomerase humana (Figura extraída de Hukezalie e Wong, 2013).

A montagem da telomerase é um processo dinâmico e altamente regulado que envolve duas ATPases específicas. A associação de TER com essas ATPases ocorre na fase S do ciclo celular, enquanto que a dissociação das ATPases ocorre imediatamente após a formação da enzima e antes desta exercer a sua ação catalítica. O local exato onde ocorre a ligação da enzima aos telômeros e o reconhecimento do substrato, i.e, da saliência 3' do segmento de DNA da extremidade telomérica, não é ainda conhecido. Em vários

estudos de microscopia com células vivas e estudos de hibridização *in situ*, foi observada co-localização de telómeros e telomerase nos corpos de Cajal na fase S do ciclo celular. Contudo, células humanas desprovidas de corpos de Cajal conseguem de forma eficiente proceder à extensão da extremidade telomérica, sugerindo que a reação catalítica não será exclusiva dessas estruturas que estão localizadas próximas do nucléolo. Após o recrutamento da telomerase para a extremidade do telómero, o acesso ao DNA telomérico de cadeia simples e o alinhamento correto da telomerase nessa região é regulada pela interação com componentes do complexo *shelterin*, especificamente TPP1 e POT1 (Hukezalie e Wong, 2013).

3.3. Ação catalítica

Estudos recentes demonstraram que a extremidade 3' dos cromossomas, quer humanos quer de várias outras espécies, é mais comprida (mais 12 a 16 nucleótidos) do que a extremidade 5' e é mais rica em resíduos de guanina (G), associando-se a proteínas que reconhecem e ligam essas guaninas de modo a (i) estabilizar as extremidades dos cromossomas e impedindo, dessa forma, a sua degradação por exonucleases, (ii) promover a localização correta dos telómeros em zonas específicas dentro do núcleo, e (iii) recrutar a telomerase, que repõe essas sequências cada vez que a célula se divide (Alberts *et al.*, 2010; Azevedo e Sunkel, 2012).

De uma forma simplificada, a extremidade 5' da cadeia formada *de novo* não pode ser replicada integralmente, pois contém as sequências iniciadoras de RNA que, ao serem removidas, deixam em cada extremidade do cromossoma uma ponta desemparelhada na extremidade 3' que não consegue ser replicada pelo processo normal de ação da polimerase. Este fragmento terminal de cadeia simples seria, normalmente, eliminado do cromossoma sintetizado *de novo* após cada ciclo de replicação, o que levaria a que estes fossem encurtando de forma progressiva ao longo das várias gerações de replicação. Contudo, através de um processo de transcrição reversa que utiliza o próprio RNA interno da enzima como molde em acoplamento com um processo de translocação, a enzima desloca-se na direção 3', aumentando ainda mais a extremidade 3' do cromossoma, e esta extremidade aumentada vai servir de modelo para a formação de fragmentos de Okazaki adicionais, permitindo, assim, a replicação da extremidade 5' que lhe é complementar

pelo complexo da polimerase e por um mecanismo idêntico ao já descrito anteriormente na seção 1.2. (Azevedo e Sunkel, 2012).

Em termos moleculares, a síntese de DNA mediada pela telomerase compreende três etapas: posicionamento e ligação do DNA, síntese da sequência telomérica na extremidade da cadeia molde de TER e realinhamento do local catalítico com a extremidade 3' do substrato (Figura 14). Ao nível da sequência de TERT, o domínio TEN efetua múltiplos contactos com a extremidade 5' da molécula de DNA, a região CTE de TERT estabiliza o híbrido DNA/RNA e o motivo E posiciona a extremidade 3' do substrato no local ativo, enquanto que os motivos específicos (*finger* e *palm*) do domínio RT recrutam os dNTPs necessários para a síntese do DNA. Como a telomerase catalisa a adição consecutiva de dNTPs à extremidade 3'OH livre do primer, é mantido um número constante de nucleótidos emparelhados entre a cadeia molde de TER e o substrato. Devido a este facto, à medida que dNTPs são adicionados à extremidade 3', ocorre dissociação do emparelhamento formado do lado 5', e a telomerase vai adicionando dNTPs até o domínio TBE, da extremidade 5' de TER, ser alcançado; a translocação da enzima repõe uma nova extremidade 3' no local catalítico e o ciclo de adição de nucleótidos/translocação da enzima é finalizado. Assim, após a síntese da primeira repetição, pode ocorrer translocação da telomerase sobre o segmento de DNA e realinhamento de TER para a síntese da segunda repetição seis nucleótidos ou, simplesmente, dissociação da molécula de DNA. Esta tendência para a síntese sucessiva de repetições de 6 nucleótidos a partir de um único *primer* é uma característica específica da telomerase, não tendo sido observada noutras RTs, e é determinada por 5 regiões de TERT (local de ancoragem no domínio TEN, IFD, motivo C, motivo 3 e CTE), que facilitam a translocação do DNA molde, impedem a dissociação entre a enzima e o substrato, e por elementos estruturais específicos de TER que afetam o emparelhamento RNA/DNA durante a translocação.

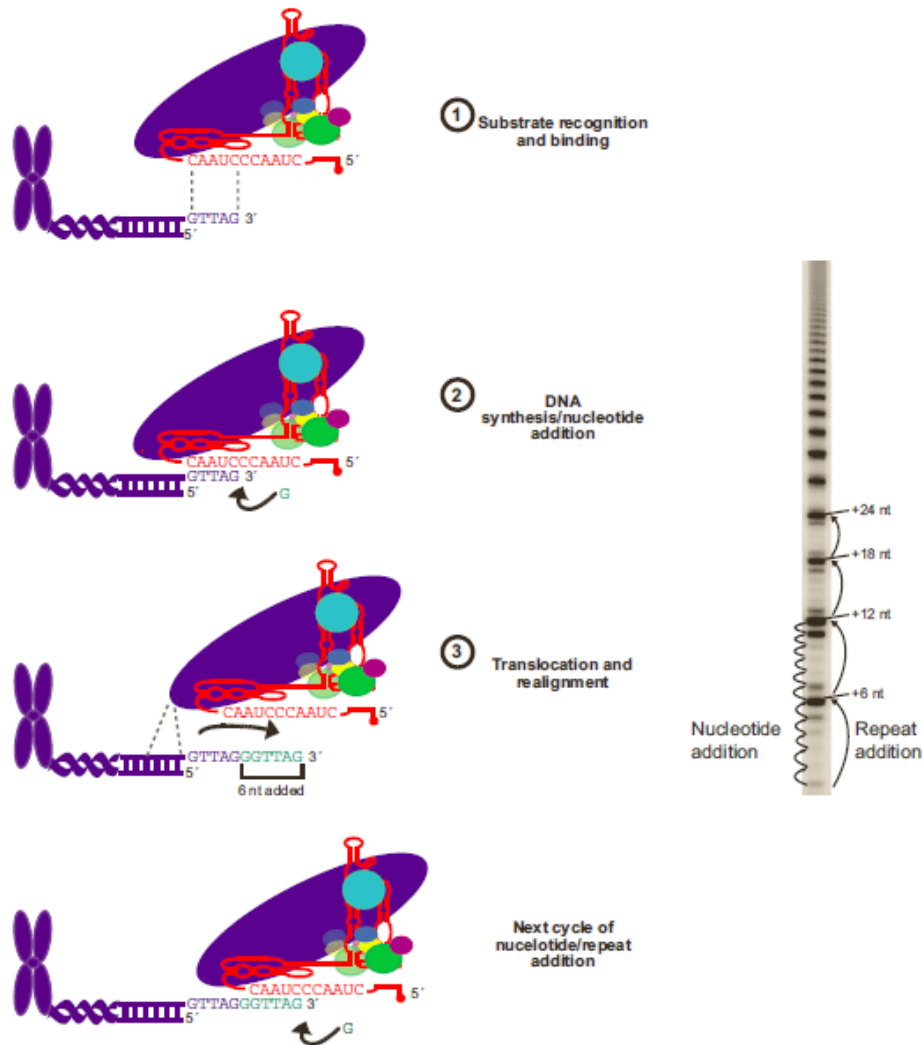


Figura 14 – Síntese do telómero pela telomerase. Diagrama da esquerda - 1) A telomerase reconhece e liga-se à saliência 3' da extremidade do DNA telomérico de cadeia simples, sendo o alinhamento da enzima sobre o substrato proporcionado pelo domínio TER; 2) A telomerase, por ação da sua atividade de transcriptase reversa, promove a incorporação de 6 dNTPs à extremidade 3' da saliência de DNA telomérico de acordo com a sequência molde do RNA da enzima; 3) Após a síntese da primeira repetição, a telomerase desloca-se sobre o substrato de DNA e realinha TER preparando para uma segunda síntese de repetição de 6 nucleótidos, ou dissocia-se do substrato. Imagem do lado direito da Figura – A adição de repetições de 6 nucleótidos é concordante com o tamanho dos fragmentos observado após separação por eletroforese e que diferem entre si por 6 nucleótidos (Figura extraída de Hukezalie e Wong, 2013).

O processo global, semi-conservativo, da replicação da cadeia dupla de DNA telomérico, ocorre como no processo convencional, isto é, a cadeia *leading* é produzida de forma

continua e a cadeia *lagging* de forma descontínua através da cópia das cadeias teloméricas molde, C e G, respetivamente. As saliências teloméricas ricas em guanina são estruturas necessárias para proteger as extremidades dos cromossomas e para prolongar os telómeros por ação da telomerase. Em células diploides humanas normais cultivadas, essas saliências são maiores nas extremidades teloméricas produzidas pela síntese da cadeia *lagging* do que pela síntese da cadeia *leading* e a telomerase parece exibir preferência pelas saliências resultantes da síntese da cadeia *leading* (Chai et al., 2006).

3.4. Regulação da atividade da telomerase

A base molecular para a regulação da atividade da telomerase é complexa e envolve vários níveis de controlo. O principal nível de controlo é a regulação da transcrição da subunidade catalítica de TERT. A TERT humana é expressa durante o desenvolvimento, mas com exceção das células proliferativas ou dos tecidos em renovação, é praticamente inexistente na maioria das células somáticas, sugerindo que o promotor de TERT é o alvo principal da regulação da atividade da enzima. No entanto, existem diversas evidências que sugerem que TERT é também submetida a controlo pós-transcricional e pós-traducional, tendo sido também descrita a regulação da transcrição da subunidade correspondente ao RNA (TR ou TER) (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Regulação transcripcional de TERT

O promotor da TERT humana (hTERT) está descrito, tendo sido identificados diversos locais de ligação a fatores de transcrição que contribuem para a modulação da expressão da enzima, por exemplo, o fator Sp1 que geralmente interatua com uma proteína de ligação à sequência TATA do promotor. Apesar do gene humano não possuir a sequência TATA, se a proteína que liga Sp1 estiver mutada, a atividade promotora de hTERT é inibida. A expressão da telomerase é controlada por fatores de transcrição codificados por oncogenes, i.e., Myc, bem como por genes supressores de tumores, i.e. WT1 (*Wilm's tumor suppressor*). Em células tumorais é observado o aumento de expressão de Myc e a inativação de WT1 e, subsequentemente, o aumento de atividade enzimática da

telomerase; a ligação de WT1 ao promotor da TERT diminui a expressão da enzima enquanto que a supressão de WT1 promove a expressão da telomerase. Também tem sido sugerido o envolvimento da proteína p53 na regulação da expressão da hTERT, essencialmente porque p53 está deficiente na maioria dos tumores. Resultados de vários trabalhos têm também indicado que o promotor de TERT está localizado num domínio de cromatina altamente condensado e associado a histonas hipoacetiladas e que o silenciamento/ativação de hTERT se encontra, por isso, sob regulação epigenética (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Regulação pós-traducional de TERT

Esta possibilidade de regulação emerge da observação de que o nível de mRNA/TERT nem sempre se correlaciona com o nível de atividade enzimática da proteína. Para além disso, nem todas as células que apresentam a enzima ativa são capazes de manter as extremidades dos telómeros (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012). Estas observações podem resultar de modificações pós-traducionais das quais se destacam as seguintes:

(i) Modificação covalente por fosforilação ou ubiquitinação. No caso da fosforilação e dependendo da via usada, poderá observar-se diminuição ou aumento da atividade da telomerase. A ubiquitinação tem impacto no tempo de semi-vida da enzima. O tempo de semi-vida da telomerase humana é de ~24-h, enquanto que o de TER é longo, ~5 dias. Adicionalmente, a sobreexpressão da ubiquitina ligase (E3) origina a degradação de TERT, resultando na diminuição da atividade da telomerase e no encurtamento dos telómeros. Estas observações sugerem que a atividade da hTER é modulada pela estabilidade de TERT. De facto, um *co-chaperone* de E3 (CHIP, *C-terminus of HSC70-interacting protein*) que normalmente produz poliubiquitinação da enzima, bloqueia a entrada de hTERT no núcleo conduzindo à sua subsequente degradação no citoplasma. O nível de interação deste *chaperone* com a enzima é máxima em G2/M, estando diminuído na fase S em que a telomerase atua sobre os telómeros, sugerindo que este *chaperone* modula o nível de atividade da telomerase ao longo do ciclo celular através da regulação do tráfego intracelular da enzima e, conseqüentemente, da sua estabilidade (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

(ii) Localização subnuclear que é dinamicamente controlada ao longo do ciclo celular contribuindo, assim, para a regulação da atividade enzimática. Vários trabalhos sugerem que o transporte da telomerase ativa para a extremidade do cromossoma requer a passagem de TER através dos corpos de Cajal via interação com uma proteína específica, TCAB1. Os corpos de Cajal atuam como centro de processamento onde TER e proteínas associadas são modificadas antes da produção da enzima ativa. Para além disso, a retenção de hTERT no nucléolo, tal como é observado após DNA danificado em que hTERT é transientemente translocada do nucleoplasma para o nucléolo, modula negativamente a atividade da telomerase (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Dosagem dos genes *TERT* e *TER*

Apenas uma cópia do gene *TERT* e do gene *TER* é observada na maioria dos organismos até agora estudados, e uma mutação nula em qualquer um destes genes tende a ser letal para o respetivo organismo. Uma vez que a amplificação dos repetivos *loci* cromossomais se correlaciona com a formação de tumores, a dosagem desses genes deverá desempenhar um papel importante na regulação da telomerase (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Produção de isoformas de TERT

O *splicing* alternado de TERT tem sido observado em diversos organismos eucarióticos, tendo sido descritas 10 variantes de *splicing* na hTERT e a sua relação com a atividade da telomerase analisada. A variante mais bem estudada (hTERT α) compreende a deleção de 183-bp com produção concomitante de uma mutação *nonsense*. A expressão de desta variante correlaciona-se com a diminuição da atividade da telomerase (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Regulação do recrutamento da telomerase para o telómero

Após a formação da partícula RNP da telomerase, ela deverá interatuar com a extremidade cromossómica. O mecanismo desta interação é razoavelmente conhecido em

leveduras. Em organismos multicelulares pouco se sabe, ainda, acerca desse processo. Tal como descrito anteriormente, em células humanas o capeamento telomérico é efetuado pelo complexo *shelterin*. Uma das proteínas deste complexo, TPP1, está envolvida no recrutamento da telomerase. TPP1 associa-se com POT1, um outro componente do complexo de *shelterin*, promovendo a interação de POT1 com o terminal 3', de cadeia simples, da extremidade do cromossoma. No entanto, não é claro o mecanismo através do qual TPP1 influencia a atividade enzimática da telomerase uma vez que a depleção de TPP1 provoca a dissociação de POT1 do telómero, ativando o mecanismo de resposta celular à danificação do DNA e interrompendo o ciclo celular, em vez do esperado encurtamento dos telómeros (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Regulação da taxa de processamento da telomerase

Após a ligação da telomerase ao terminal de cadeia simples do telómero, ocorre a incorporação das repetições de DNA. Neste processo, podem ser incorporadas múltiplas repetições num só evento, ou apenas 1 ou 2 repetições. O domínio da enzima que promove a adição de múltiplas repetições é o RAP (*Repeat addition processivity*) que é influenciado, *in vitro*, por TPP1, o fator putativo de recrutamento da telomerase humana. *In vivo* foi observada uma correlação surpreendente entre RAP e o comprimento do telómero. A telomerase é preferencialmente recrutada para telómeros curtos. No entanto, a expressão de RAP está aumentada quando o comprimento dos telómeros é crítico. Esta atividade da telomerase é regulada em células tumorais. A telomerase humana atua em todas as extremidades teloméricas em cada ciclo celular. Contudo, RAP é modulado consoante a capacidade da enzima para estabelecer ou manter a homeostasia relativa ao comprimento telomérico. Em telómeros curtos, resultantes da inibição da telomerase, múltiplas moléculas de telomerase podem interagir sequencialmente com a extremidade de cada cromossoma e rapidamente promover a extensão do telómero. No caso contrário, em que o comprimento telomérico se encontra em homeostasia, ocorre uma forte estimulação de RAP e apenas uma única molécula de telomerase é associada a cada telómero, com a adição de ~10 repetições antes da dissociação da enzima (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

Regulação da telomerase por ação de TERRA

Estudos recentes sugerem que TERRA interatua com uma proteína específica de ligação ao RNA, RNPA1, facilitando, deste modo, a interação de proteínas de ligação à cadeia simples da extremidade telomérica. Durante a replicação, a extremidade 3' do telómero está inicialmente ligada a RAP que, em seguida, é substituída por RNPA1. Esta última dissocia-se do DNA através da interação com TERRA, permitindo que os componentes POT1/TPP1 do complexo de *shelterin* se liguem e produzam uma extremidade telomérica funcional. Para além disso, como TERRA é complementar à sequência molde de TER, é possível que regule negativamente a atividade da telomerase. De facto, em extratos nucleares de células humanas, TERRA está fisicamente associada à telomerase e, tal como postulado, observa-se o emparelhamento com a cadeia molde complementar de TER. Contudo, também existem evidências que suportam a possibilidade de TERRA interatuar com TERT independentemente de TER (Cifuentes-Rojas e Shippen, 2012).

4. Regulação do nível de TERRA e comprimento dos telómeros

A transcrição de TERRA é promovida pela proteína TRF1 uma vez que o seu silenciamento conduz à diminuição do nível de expressão de TERRA (Wang *et al.*, 2015).

TERRA é rapidamente degradado pela exonuclease nuclear 5' > 3' Rat1 codificada pelo gene humano *Xrn2* (Maicher *et al.*, 2012).

Em células humanas, a repressão da expressão de TERRA também depende do grau de condensação da cromatina na região subtelomérica/telomérica uma vez que a co-deleção das enzimas DNA metiltransferases DNMT1 e DNMT3b produz um aumento substancial de moléculas TERRA (Maicher *et al.*, 2012). Para além disso, as regiões subteloméricas apresentam-se sob a forma de heterocromatina constitutiva, a qual é caracterizada por níveis elevados de lisina 9 trimetilada na histona 3, lisina 20 trimetilada na histona 4 e metilação CpG. A diminuição destes marcadores heterocromatínicos sugere um certo grau de descondensação da cromatina que é acompanhada por encurtamento telomérico. Adicionalmente, a alongação telomérica reprime a expressão de TERRA através do aumento do nível de histona 3 trimetilada no resíduo de lisina 9. Na extremidade de cerca

de 20 cromossomas humanos, é observado um padrão de 3 elementos repetitivos, respetivamente 61, 29 e 37-pb, que está localizado 27-pb a montante do local de iniciação da transcrição de TERRA, na região subtelomérica, e que têm a capacidade de promover a transcrição de TERRA. Esta observação sugere que estes elementos repetitivos deverão fazer parte da região promotora de TERRA. Para além disso, uma vez que a metilação desses elementos repetitivos depende de DNMT1 e DNMT3b, estas metiltransferases exercerão efeito repressivo diretamente nos elementos do promotor (Maicher *et al.*, 2012). Deste modo, a regulação do comprimento do telómero por ação de TERRA dependerá de condições fisiológicas específicas que tenham impacto sobre a expressão das metiltransferases e, conseqüentemente, sobre a metilação dos elementos repetitivos da região promotora de TERRA.

Em células humanas, a repressão de TERRA também depende de efetores envolvidos no processo específico de degradação do RNA – NMD (*Nonsense mediated RNA decay*). Quando estas proteínas estão disfuncionais, o nível global de TERRA não aumenta porque o seu *turnover* mantém-se inalterado, mas ocorre uma grande acumulação de TERRA junto às extremidades dos cromossomas (Maicher *et al.*, 2012).

Em células humanas, a regulação de TERRA também pode ocorrer de forma dependente do ciclo celular. A sua expressão é máxima na fase G1, diminui progressivamente na fase S e atinge o nível mínimo em S/G2. O nível de TERRA volta a aumentar gradualmente no final da mitose, proporcionando às células-filhas, em fase G1, um nível elevado de TERRA (Maicher *et al.*, 2012).

Em telómeros encurtados, TERRA é expressa, acumulando-se na região nuclear que contém os componentes da telomerase e recrutando a telomerase para esses telómeros a partir dos quais TERRA foi produzido. Durante a fase S tardia, em que o nível de TERRA diminui, a telomerase está preferencialmente ativada e envolvida na elongação dos telómeros encurtados. No entanto, tendo sido descrito que TERRA inibe a atividade da telomerase *in vitro* através da ligação a TER e TERT, é questionável a fase do ciclo celular em que TERRA regula a atividade da telomerase e a forma como TERRA coordena o recrutamento da telomerase para os telómeros e inibe a atividade da telomerase (Wang *et al.*, 2015).

De salientar, ainda, que a maioria dos fatores de regulação de TERRA parece estar associado com a sua repressão (transcrição, localização, degradação), sugerindo que uma

expressão elevada de TERRA deverá ter consequências negativas. Consentaneamente com esta observação, múltiplas correlações inversas entre o nível de TERRA e o comprimento dos telómeros (i.e. nível elevado de TERRA = encurtamento/perda telómero) têm sido estabelecidas (Maicher *et al.*, 2012).

Uma vez que a expressão de TERRA está claramente relacionada com a atividade da telomerase e com o comprimento dos telómeros, a continuidade da investigação neste domínio é importante e deverá fornecer novos alvos para o diagnóstico e terapia de doenças associadas a alterações no comprimento dos telómeros. Neste sentido, é possível imaginar que a preservação (no caso de síndromes provocados pelo encurtamento do telómero) ou a inativação (no caso do cancro) da função telomérica poderá ser manipulada através da inibição ou ativação de TERRA, respetivamente (Maicher *et al.*, 2012).

5. Impacto biológico de alterações no comprimento dos telómeros

O problema da replicação dos segmentos de DNA das extremidades dos cromossomas observa-se na maioria das células humanas somáticas e tem geralmente impacto no comprimento dos telómeros que tende a diminuir em cada divisão celular. De facto, a telomerase é expressa durante a embriogénese, cessando após a conclusão desse processo na maioria das células somáticas saudáveis. No entanto, certas populações de células estaminais e células de tecidos proliferativos, tais como linfócitos ativados, exibem atividade de telomerase. Contudo, como nessas células também se observa encurtamento dos telómeros, o nível de atividade enzimática não deverá ser suficiente para ultrapassar a limitação replicativa do DNA da extremidade telomérica (Maicher *et al.*, 2012). Por isso, o complexo enzimático da telomerase deverá atuar nessas células segundo um modelo de regulação de alta precisão em que a senescência celular (cessação de divisão celular) prematura deverá resultar da perda parcial ou total de função de alguns componentes desse complexo enzimático (Zvereva *et al.*, 2010).

Tal como já referido anteriormente, o encurtamento dos telómeros que ocorre em cada divisão celular resulta da incapacidade da maquinaria de replicação do DNA em assegurar a replicação da extremidade das moléculas lineares de DNA e da degradação mediada por exonucleases. De facto, se os telómeros atingirem um comprimento crítico deixam de

poder interatuar com o complexo *shelterin* ficando, subsequentemente, desprotegidos e passando a ser reconhecidos e processados pela célula como DNA danificado, o que poderá conduzir à senescência e/ou apoptose celular (Maicher *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Contudo, a senescência não resultará diretamente do encurtamento dos telómeros, mas da impossibilidade de manter estável o complexo DNA telomérico-complexo proteico devido a esse encurtamento (Zvereva *et al.*, 2010). O número de divisões que ocorrem nas células somáticas dos mamíferos antes destas entrarem em senescência é conhecido por limite de Hayflick (Zvereva *et al.*, 2010). Assim, as células jovens não têm fenótipos envelhecidos, reproduzindo-se de forma uniforme e a uma velocidade constante até ao momento em que os telómeros apresentam um tamanho diminuto, o chamado Limite de Hayflick (Hornsby, 2007). Ao longo da vida do indivíduo, existem células em replicação e células já em senescência. Com o passar do tempo, e com o aumento do número de replicações, mais células irão alcançar o Limite de Hayflick, estado esse em que os telómeros estarão em estado crítico e diminuto e em que as células perderão a sua capacidade de divisão, entrando então em senescência. Assim, com a idade o aumento de células em senescência será constante, até ao momento em que todas elas perdem a capacidade de divisão (Shay e Wright, 2011). No entanto, no caso de células que apresentam comprometimento do processo de monitorização da qualidade do DNA produzido na fase S do ciclo celular, os telómeros encurtados poderão ser tolerados pela célula, mas a possibilidade de fusão cromossómica ou instabilidade genética aumenta, podendo desencadear o processo carcinogénico (Maicher *et al.*, 2012).

Dada a relação que é observada entre a redução do comprimento dos telómeros em células somáticas e o desencadeamento do processo de senescência ao longo do tempo, o comprimento dos telómeros, e em particular a proporção de telómeros curtos, têm sido propostos como um biomarcador do envelhecimento celular e envelhecimento cronológico (Armanios, 2013; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012; Zvereva *et al.*, 2010). No entanto, a quantidade de telomerase existente nos diversos tipos celulares deverá ser altamente regulada, exatamente porque o encurtamento dos telómeros, associado a uma reduzida atividade da telomerase e, subsequente, senescência celular limitam a capacidade de divisão celular, enquanto que a ativação da telomerase está associada a um aumento da capacidade proliferativa das células e, por isso, ao cancro (Zvereva *et al.*, 2010). De facto, em cerca de 85-90% dos casos é observada a reativação da telomerase (Hukezalie e Wong, 2013; Maicher *et al.*, 2012). Por isso, se por um lado

o encurtamento dos telómeros associado à perda dessa estrutura cromossómica terminal pode resultar em instabilidade genómica carcinogénica, na maioria das células tumorais a telomerase é reativada assegurando a manutenção dos telómeros. Assim, apesar da expressão da telomerase não ser considerada oncogénica, ela permite que células tumorais mantenham uma elevada taxa proliferativa/imortalidade (Maicher *et al.*, 2012).

Presentemente são conhecidos dois mecanismos celulares que impedem o encurtamento dos telómeros: alongação dos telómeros pela telomerase, preferencialmente dos telómeros mais pequenos para os quais a telomerase tem maior afinidade, e o mecanismo alternativo e aparentemente secundário baseado num processo de reparação dirigido por homologia e que tendo sido observado em cerca de 10-15% das células tumorais humanas (Wang *et al.*, 2015). Já a eficiência da telomerase depende, essencialmente, do número de repetições teloméricas existentes na extremidade dos telómeros. De facto, a redução do comprimento dos telómeros é observada em várias doenças causadas por uma disfunção primária da telomerase.

A maioria dos métodos de quantificação do comprimento dos telómeros tem sido aplicada ao estudo da associação entre o encurtamento dos telómeros e o envelhecimento. Tal como referido anteriormente, essa associação é apoiada pelo facto da taxa de encurtamento dos telómeros aumentar com o envelhecimento ou em síndromes de envelhecimento precoce, tais como a Disqueratose Congénita ou a anemia aplástica (Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012). No entanto, vários estudos sugerem que o encurtamento dos telómeros também é afetado por fatores ambientais, muitas das vezes associados ao estilo de vida, nomeadamente tabagismo, alimentação e *stress* psicológico, sugerindo que o comprimento dos telómeros pode ser um indicador do estado geral de saúde e da idade biológica dos indivíduos. Por isso, a medição do comprimento de telómeros *per si* não tem qualquer valor biológico, exigindo a comparação com o comprimento dos telómeros de uma amostra de referência representativa da população (Vera e Blasco, 2012).

A Figura 15 ilustra a relação entre o comprimento dos telómeros e a longevidade da célula.

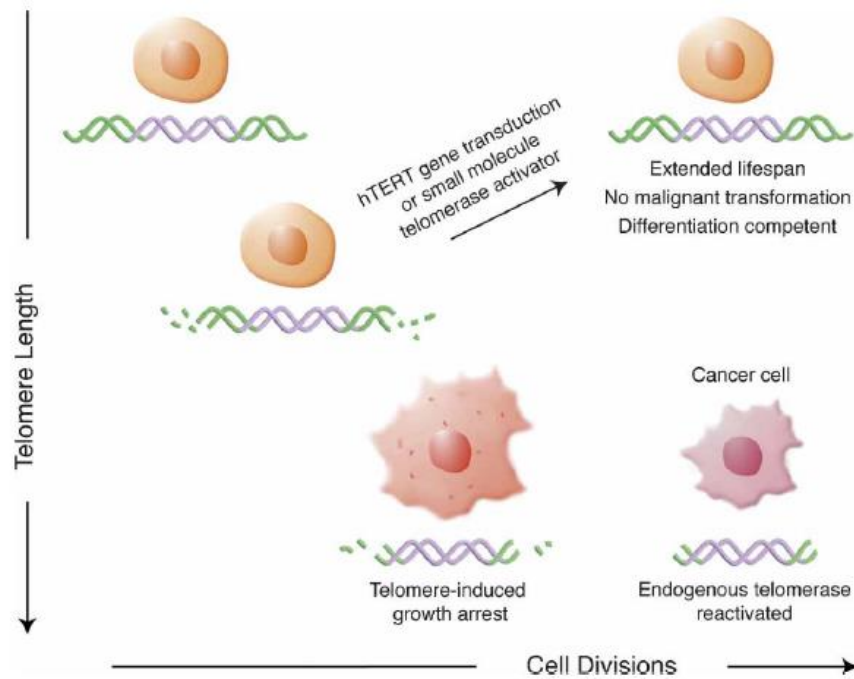


Figura 15 – Impacto biológico do comprimento dos telómeros. Na maior parte das células somáticas humanas, a ausência de atividade da telomerase resulta no encurtamento dos telómeros e subsequente envelhecimento. A atividade da telomerase pode ser restaurada em células humanas através da transdução do gene hTERT ou potencialmente através da terapia com drogas, com eventual prolongamento do ciclo de vida dessas células e impacto na longevidade. Por outro lado, a ausência da telomerase atua como uma limitação no aparecimento e progressão do cancro, a menos que se verifique reativação da telomerase (Figura extraída de Hornsby, 2007).

A primeira doença descrita associada com o encurtamento e disfunção dos telómeros foi a disqueratose congénita (DC). Esta doença rara é caracterizada por pigmentação da pele, unhas atróficas, leucoplasia e morte prematura frequentemente por falência de medula óssea. Em doentes com um quadro clínico de disqueratose congénita foram identificadas mutações no complexo central da telomerase (TER, TERT e disquerina), TIN2 (componente do complexo *shelterin*), Nop10, Nhp2 e TCAB1. Enquanto TER, TERT e TIN2 estão diretamente envolvidas na manutenção da atividade da telomerase, as restantes proteínas desempenham múltiplas funções ao nível da maturação do RNA, mas também um importante papel na estabilidade de TER e/ou associação da telomerase com os telómeros (García e Feldstein, 2014; Kong *et al.*, 2013; Maicher *et al.*, 2012). A DC

ocorre principalmente no sexo masculino e manifesta-se clinicamente entre os 5 e os 12 anos de idade. Mesmo em doentes com a mesma mutação genética, as manifestações da doença são variáveis, dificultando um diagnóstico correto da doença (García e Teruya-Feldstein, 2014). Não há terapias direcionadas para a DC e os doentes geralmente morrem com síndrome de insuficiência da medula óssea que é uma das complicações mais comuns e graves, e também a principal causa de morte, seguido de predisposição ao aparecimento de tumores e insuficiência pulmonar fatal. O transplante de células-tronco hematopoéticas alogénico é o único tratamento curativo em doentes com DC e que apresentam insuficiência da medula óssea. No entanto, a taxa de sucesso associada ao transplante é muitas vezes comprometida, não só pelo envolvimento funcional de outros órgãos, especialmente em doentes sob quimioterapia ou quimiorradioterapia, como também pela ineficácia, nestes doentes, da terapia imunossupressora, a qual aumentaria a taxa de sucesso do transplante (García e Teruya-Feldstein, 2014).

Relativamente ao aumento da expressão da telomerase, ela tem sido associada a mutações no promotor do gene da telomerase em melanoma, gliomas, cancro da tiróide, cancro da bexiga e carcinoma hepatocelular. Adicionalmente, variantes genéticas de POT1 que interferem com o capeamento correto dos telómeros têm sido descritas em doentes com melanoma familiar, glioma familiar ou leucemia linfocítica crónica. O facto de todas essas variantes serem caracterizadas por telómeros alongados sugere que a conjugação do aumento do comprimento dos telómeros com a presença de aberrações teloméricas induzidas por essas mutações em POT1 favorecem o aparecimento e/ou progressão de tumores (Martinez e Blasco, 2015).

Em 1990, num primeiro estudo das medições do comprimento dos telómeros em seres humanos, foi observado que o comprimento dos telómeros em leucócitos diminui com o aumento da idade cronológica, tendo sido especulado que o comprimento dos telómeros poderia ser um biomarcador de idade biológica celular e, assim, indicar o risco de doenças relacionadas com a idade, tais como o cancro, doenças cardiovasculares, doença pulmonar, diabetes entre outras (Bojesen, 2013). Posteriormente, uma grande variedade de estudos têm mostrado uma associação entre a proporção de telómeros curtos e patologias relacionadas com a idade e o cancro e, subsequentemente, como a expectativa de vida e a mortalidade (Vera e Blasco, 2012; Maicher *et al.*, 2012; Bojesen, 2013). No entanto, em várias células de órgãos tais como o rim ou o fígado, foi observada uma relação entre a idade do organismo e o comprimento telomérico, ao passo que noutras

células de tecidos que não sofrem mitose (como neurónios e células do músculo cardíaco), as células envelhecem de igual modo, independentemente do comprimento dos telómeros (Tumpel e Rudolph, 2012). Assim, se por um lado não é, ainda, inteiramente clara a existência de uma relação direta entre o envelhecimento de algumas células e o comprimento dos telómeros dessas células, por outro lado a associação entre síndromes de envelhecimento prematuro e o encurtamento acelerado dos telómeros está relativamente bem estabelecida.

A importância biológica da telomerase, não só na regulação do comprimento dos telómeros mas também noutros eventos tais como reparação do DNA, sobrevivência e morte celular, manutenção das células e regulação da expressão genética, e a sua associação a doenças diversas, nomeadamente cancro, doenças genéticas e situações de imunossupressão, bem como a observação de ausência de atividade da telomerase em células somáticas saudáveis e sua reativação em cerca de de 85-90% dos cancros (Hukezalie e Wong, 2012; Maicher *et al.*, 2012), torna esta enzima um potencial e atrativo alvo terapêutico (Sprouse *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de inibidores da telomerase para o tratamento do cancro tem sido uma área de investigação intensa no últimos anos uma vez que através da inibição da enzima é possível matar células cancerígenas e, ao mesmo tempo, limitar o efeito de toxicidade sobre células vizinhas. Vários mecanismos de inibição da telomerase foram explorados como agentes terapêuticos, nomeadamente a utilização de um adenovírus oncolítico seletivo para células a expressar telomerase (*telomelysin*) que, através da replicação viral, leva à destruição seletiva de células malignas por apoptose. No entanto, esta abordagem permanece como terapia neoadjuvante promissora (Sprouse *et al.*, 2012). Adicionalmente, vários componentes sintéticos têm sido criados para atuarem como inibidores de telomerase, tais como o composto GRN163L (oligonucleotídeo inibidor competitivo da telomerase utilizado em cancros da mama, próstata, mieloma e leucemia). Em termos de mecanismo de ação, podem ter efeito direto sobre a telomerase, inibindo-a, ou indireta, causando a morte da célula. Na sua generalidade são, contudo, altamente tóxicos (Sprouse *et al.*, 2012). Outros exemplos são a alicina (um organofosforado presente no alho), a curcumina (um fenol presente no açafrão), o flavonolignano (presente na planta cardo de leite), e ainda galato de epigalocatequina (presente no chá verde) que bloqueiam a expressão de TERT e, subsequentemente, a atividade da telomerase (Sprouse *et al.*, 2012).

Ao nível dos ativadores da telomerase, uma linha de investigação importante visa a reversão do processo natural de envelhecimento celular e o tratamento dos sintomas de envelhecimento, e os resultados poderão ter um eventual impacto ao nível da medicina regenerativa e da cosmética (Bojesen, 2013; Hornsby, 2007; Sprouse *et al.*, 2012, Takubo *et al.*, 2010). Atualmente, a ativação da telomerase está também a ser estudada para a sua utilização futura em pacientes imunodeprimidos com o objetivo de estimular a proliferação de células T (Sprouse *et al.*, 2012). Como exemplo de ativadores da telomerase, o TAT2 (cicloastragenol) ativa a telomerase de linfócitos T que já não estão em proliferação melhorando a função imunológica e da pele. Outro exemplo são certos fitoquímicos tais como resveratrol e genisteína. No caso do resveratrol foi observada ativação da telomerase humana em células do epitélio mamário e em células progenitoras endoteliais, enquanto que no caso da genisteína foi observada a ativação da telomerase em modelos celulares de vários tipos de tumores malignos (próstata, linhas celulares LNCaP e DU-145; mama, MCF-7 e ovário, SKOV-3). No entanto, estudos adicionais terão, ainda, de ser efetuados para determinar os mecanismos de ação, bem como a eficácia e as condições de segurança para a administração destes produtos como agentes ativadores da telomerase. Adicionalmente, há ainda pouca informação sobre o efeito da telomerase em produtos farmacêuticos, nomeadamente ao nível da sua associação com um crescimento celular descontrolado. Esta possibilidade é suportada pela observação de que produtos químicos não farmacêuticos, como por exemplo um importante componente dos cigarros, a cotinina, ativam a telomerase causando uma proliferação anormal de células (Sprouse *et al.*, 2012).

III- Conclusão

Desde tempos remotos que o corpo humano é alvo da curiosidade do Homem. Foi devido a essa curiosidade que o estudo da composição e do funcionamento do corpo humano foi sendo desenvolvido e atingiu o nível de conhecimento disponível nos dias de hoje. Deste modo, foi identificada a informação genética humana, ou seja, o historial biológico herdado dos nossos progenitores e que se encontra codificado no DNA, o qual, por sua vez, se encontra organizado em cromossomas. Nas extremidades de cada cromossoma, existem regiões especializadas, que se designam telómeros. Estes têm como função proteger as extremidades dos cromossomas evitando danos no DNA e perda de informação genética relevante. Como a replicação da maioria das células implica encurtamento dos telómeros, quando estes alcançam o seu limite (Limite de Hayflick) a célula entra em senescência, cessando a sua capacidade de divisão, mas mantendo o seu metabolismo até que seja desencadeada a apoptose. No entanto, algumas células, tais como células germinativas e algumas células-tronco, são capazes de produzir uma enzima que é designada por telomerase.

A telomerase é uma ribonucleoproteína que inclui RNA, que serve de molde para a síntese do DNA telomérico, e uma subunidade catalítica com atividade de transcriptase reversa e cuja função é a síntese das sequências repetitivas de DNA telomérico. Contém ainda componentes proteicos auxiliares que são essenciais o funcionamento da telomerase *in vivo*. Alguns desses componentes são necessários para a fixação da telomerase ao telómero numa fase específica do ciclo celular, enquanto outros são necessários para a regulação da atividade da telomerase (Hukezalie e Wong, 2013; Kupiec, 2013; Zhou, *et al.*, 2014; Zvereva *et al.*, 2010). Esta enzima potencia a reposição das sequências de DNA telomérico cada vez que a célula se divide, desacelerando o processo de encurtamento dos telómeros.

Ao longo do tempo, estudos de biologia molecular e celular do complexo telómero/telomerase foram conduzidos com vista à obtenção de respostas para questões científicas importantes e com impacto em biomedicina (Hukezalie e Wong, 2013; Kupiec, 2013; Maicher *et al.*, 2012; Pickett e Reddel, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012; Zhou, *et al.*, 2014; Zvereva *et al.*, 2010). Um primeiro aspeto importante que surgiu desses estudos é a relação do complexo telómero/telomerase com o envelhecimento. Os

telómeros funcionam como “contadores internos” do tempo de vida de cada célula uma vez que, a cada replicação, o telómero vai encurtando e quando chega ao seu limite, de Hayflick, a célula entra em senescência ou em apoptose. Ao longo de toda a vida do indivíduo, há no seu organismo células em senescência. Com o aumentar dos anos do organismo, o número de células que entram em senescência e, conseqüentemente, em apoptose aumenta, causando o seu envelhecimento global. A telomerase é capaz de prolongar o tempo de vida de uma célula. Contudo, esta enzima apenas se encontra presente em alguns tipos de células, como as células germinativas, as células-tronco e as células cancerígenas. Estas observações sugerem potenciais benefícios da regulação da atividade da telomerase. Farmaceuticamente, a inibição da telomerase pode ser uma opção importante na terapia do cancro em conjunto com quimioterápicos tradicionais, enquanto que a ativação da telomerase pode ser útil no tratamento de doenças relacionadas com a idade, potenciando o rejuvenescimento. E, de facto, notáveis avanços têm sido efetuados sobre a relação do complexo telómero/telomerase com o envelhecimento celular e o desenvolvimento de tumores, implicando-o como um promissor biomarcador e/ou potencial alvo terapêutico para estas doenças. Deste modo, é possível que, no futuro, a análise da ativação de telomerase em algumas células venha a representar uma forma de avaliar a predisposição ou a presença de cancro. Mais audaciosa ainda é a proposta de utilização de inibidores de telomerase para o controlo da propagação de células tumorais, fazendo com que estas voltem a encontrar um ciclo de vida estável, entrando em senescência e apoptose, contornando assim a característica da “imortalidade” que as células cancerígenas apresentam. No entanto, se os efeitos a longo prazo da regulação da telomerase serão positivos ou negativos não é, ainda, claro (Sprouse *et al.*, 2012).

Em conclusão, o estudo do comprimento dos telómeros é um tema de grande interesse dada a sua ampla aplicabilidade em estudos de investigação e na prática clínica e que incluem envelhecimento e mecanismos de doença (Pickett e Reddel, 2012; Turner *et al.*, 2014; Vera e Blasco, 2012). Através do estudo do complexo telómero/telomerase podem ser desenhadas estratégias, tanto para a cura de terminadas patologias como para o atraso do envelhecimento, podendo até vir a permitir manter a juventude por um maior período de tempo, dilatando ainda mais o prazo médio de vida da população (Armanios, 2013). Apesar dos notáveis avanços científicos verificados nos últimos anos será, contudo, importante dar continuidade à investigação nesta área uma vez que ainda subsistem

questões que não são, ainda, claras tais como as diferenças existentes nas vias de regulação do comprimento dos telómeros em células normais e tumorais, o nível de encurtamento dos telómeros que está associado com o aparecimento das doenças e se este varia entre indivíduos e entre diferentes tecidos do mesmo indivíduo, e os detalhes do mecanismo de regulação epigenético que assegura a biologia do telómero (Martinez e Blasco, 2015).

IV- Bibliografia

Aladjem M.I. (2007) Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nature Reviews Genetics* 8:588-600.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed, Artmed, pp. 195-294.

Armanios, M. (2013). Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *The Journal of Clinical Investigation* 123:996-1002.

Armanios, M., Blackburn, E. H. (2012). The telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics* 13:693-704.

Aubert, G., Hills, M., Lansdorp, P.M. (2012). Telomere length measurement- caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res* 730:59-67.

Azevedo, C., Sunkel, C. E. (2012). *Biologia Celular e Molecular*. 5ª ed, Lidel, pp. 139-203.

Bojesen, S. E. (2013). Telomeres and human health. *Journal of Internal Medicine* 274:399-413.

Chai, W., Du, Q., Shay J.W., Wright, W.E. (2006). Human telomeres have diferente overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol Cell* 21 (3):427-435.

Chesnokov I.N. (2007). Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol* 256:69-109.

Cifuentes-Rojas, C., Shippen, DE. (2012). Telomerase Regulation. *Mutat Res* 730 (1-2):20-27.

García, M. S. F., Feldstein, J. T. (2014). The diagnosis and treatment of dyskeratosis congenital: a review. *Journal of Blood Medicine* 5:157-167.

Hornsby, P. J. (2007) Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol* 42(7):575-581.

- Hukezalie, K., Wong, J. (2013). Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *FEBS the Journal* 280:3194-3204.
- Kong, C., Lee, W. X., Wang, X. (2013). Telomerase shortening in human diseases. *FEBS the Journal* 280:3180-3193.
- Kupiec, M. (2013). Biology of telomeres: lessons from budding yeast. *FEMS Microbiol Reviews* 38 (2):144-171.
- Luke, B., Lingner, J. (2009). TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *EMBO J* 28 (17):2503-2510.
- Maicher, A., Kastner, L., Luke, B. (2012). Telomeres and disease: Enter TERRA. *RNA Biology* 9 (6):843-849.
- Martínez, P., Blasco, M. (2015). Replication through telomerase: a means to an end. *Trends Biochemistry Sciences* 40 (9):504-515.
- Pickett, H. A., Reddel, R. R. (2012). The role of telomere trimming in normal telomere length dynamics. *Cell cycle* 11 (7):1309-1315.
- Shay, J. W., Wright W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biology* 21 (6):349-353.
- Sprouse, A. A., Steding, C. E., Herbert, B. S. (2012). Pharmaceutical regulation of telomerase and its clinical. *Journal Cell Molecular Medicine* 16 (1):1-7.
- Strachan, T., Read, A. P. (2012). *Genética Molecular Humana*. 2ª ed, Artmed, pp. 1-9.
- Takubo, K., Aida, J., Zumiya-Shimomura, N., Ishikawa, N., Swabe, R., Shiraishi, H., Arail, T., Nakamura, K. (2010). Changes of telomere length with aging. *Japan Geriatrics Society* 10 (1):S197-S206.
- Tumpel, S., Rudolph, K., L. (2012). The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266:28-39.

Turner, K. J., Vasu, V., Greenall, J., Griffin, D. K. (2014). Telomere length analysis and preterm infant health: the importance of assay design in the search for novel biomarkers. *Biomarkers in Medicine* 8 (4):485-498.

Vera, E., Blasco, M. A. (2012). Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging* 4 (6) 379-392.

Wang, C., Zhao, L., Lu, S. (2015). Role of TERRA in the Regulation of Telomere Length. *International Journal of Biological Sciences* 11 (3):316-323.

Zhou, J., Ding, D., Wang, M., Cong, Y. (2014). Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *Biochemistry and Molecular Biology* 47 (1):8-14.

Zvereva, M., Shcherbakova, D., Dontsova, O. (2010). Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation. *Biochemistry* 75 (13):1563-1583.