



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

DIOGO ANDRÉ FONSECA CARRIÇO

**TELOMERASE: A SUA RELEVÂNCIA NO
ENVELHECIMENTO E CANCRO**

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GERIATRIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR MANUEL TEIXEIRA MARQUES VERÍSSIMO**

MARÇO/2016

***TELOMERASE: A SUA RELEVÂNCIA NO ENVELHECIMENTO
E CANCRO***

Autor: Diogo André Fonseca Carriço

Estudante do Mestrado Integrado em Medicina da
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Trabalho realizado sob orientação de:

Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo

*Trabalho apresentado à Universidade de Coimbra para
cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do
grau de Mestre em Medicina, sob orientação científica do
Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo*

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	1
Resumo	2
Palavras-chave	4
Abstract	5
Keywords	7
Introdução	8
Objetivos	9
Material e Método	10
Desenvolvimento	11
1-Definição	11
2-Contexto Histórico	12
3-Estrutura da Telomerase	14
4-Função da Telomerase.....	16
5-Telomerase e Envelhecimento.....	17
5.1-Perspetivas de Tratamento do Envelhecimento.....	22
6-Telomerase e Cancro	27
6.1-Fármacos dirigidos	34
6.2-Imunoterapia.....	37
Conclusão	39
Referências Bibliográficas	42
Agradecimentos	47

Lista de Abreviaturas

TERT - transcriptase reversa da telomerase

TR ou TERC – subunidade de ARN da telomerase

DKC1 – subunidade de disquerina da telomerase

3' – terminação três linha

5' - terminação cinco linha

TAT2 - molécula ativadora da telomerase

Ensaio TRAP – “telomere repeat amplification protocol”

ALT - Alongamento Alternativo dos Telómeros

TAT2 - molécula ativadora da telomerase

DSB - quebras de cadeia dupla

Resumo

Este trabalho tem como objetivo explorar a relevância da telomerase em tratamentos futuros e revelar semelhanças da fisiopatologia do envelhecimento e cancro. Fiz uma breve revisão de vários artigos na área de geriatria, oncologia e gerontologia. Utilizei a rede privada virtual da Universidade de Coimbra. A telomerase é ativa em células estaminais e outras de alta taxa de divisão, encontra-se ativa também em 90% das células tumorais. A atividade da telomerase é nula nas células somáticas diferenciadas. É amplamente discutido se a telomerase é o fator que permite a estas células ultrapassar o limite de Hayflick e atingir a imortalização.

A regeneração de tecidos e a formação de tumores parecem ter como passo necessário a ativação da telomerase. Por um lado a ativação parece permitir a renovação tecidual e consequente reversão de alguns efeitos do envelhecimento. Por outro lado a inibição da telomerase pode ser uma ferramenta dirigida a cessar a divisão celular em carcinomas.

Estudos em ratinhos mostraram que a promoção da telomerase é certamente uma faca de dois gumes, pois quando a renovação tecidual é promovida, ao mesmo tempo a oncogénese também é.

Em ensaios clínicos a inibição da telomerase com oligonucleótidos homólogos da subunidade catalítica da telomerase, nomeadamente o Imetelstat, revelou-se promissor na reversão de mielofibrose em doentes selecionados. Apesar da hepatotoxicidade elevada, conseguiu produzir remissões histológicas consistentes em doentes com mielofibrose acelerada, a remissão nunca fora conseguida com outros fármacos. O desenvolvimento de outras terapias dirigidas ao cancro com melhoria na distribuição e penetração celular é esperado.

A administração de telomerase no tratamento dos sintomas de envelhecimento revela-se ineficaz. A reparação dos telómeros parece não curar em pleno o dano e desgaste feito à

célula durante a mitose. A telomerase não repara os organelos, mas pode ser fator limitante a montante, por isso fica em aberto a possibilidade da criação outro tipo de terapias.

O aparato telómero e telomerase é complexo, a sua manipulação com knock-out, promoção de genes ou uso de substâncias agonistas, homólogas ou inibidoras carece ainda de reprodução técnica e rigor.

Existe uma grande variação no comportamento dos telómeros entre indivíduos e entre células do mesmo indivíduo, eles têm fraco valor preditivo no envelhecimento. As variações mais consistentes aparecem em células expostas a grande taxa de divisão.

A atividade da telomerase e comprimento dos telómeros é mais indicativo da taxa de divisão de uma célula e não da expectativa de vida do organismo. O comprimento dos telómeros parece ser um bom indicador do estado atual da célula no que diz respeito à atividade mitótica.

As evidências sugerem que o estado de encurtamento ou alongamento dos telómeros não é a causa do envelhecimento celular, mas sim uma das consequências. Adicionalmente o encurtamento parece não ser necessário para que haja envelhecimento.

A ativação da telomerase tem sido observada em cerca de 90% de todos os tumores humanos, o que sugere que a imortalidade conferida pela telomerase desempenha um papel chave no desenvolvimento do cancro. Infiro que o encurtamento dos telómeros não têm um papel muito relevante na apoptose celular, mas a ativação das telomerasas com manutenção dos telómeros parece ser importante na imortalização tumoral.

A telomerase será um alvo importante na terapia tanto do cancro e como do envelhecimento, porém os métodos atuais da sua modulação revelam-se muito insuficientes.

O telómero protege o genoma de recombinações durante a divisão celular, é sobretudo desta forma que o telómero protege os tecidos do envelhecimento e cancro.

Palavras-Chave

Terapia com moduladores da telomerase

Telómero

Telomerase

Limite da divisão celular

Cancro

Envelhecimento

Limite de Hayflick

Imetelstat

Abstract

This study aims to explore the relevance of telomerase in future treatments and reveal similarities in pathophysiology of aging and cancer. I made a brief review of several articles in the areas of geriatrics, oncology and gerontology. I used the virtual private network of the University of Coimbra. Telomerase is active in stem cells and other cells with high rate of division, it is active also in 90% of tumor cells.. Telomerase activity is null in differentiated somatic cells.

It is widely debated whether telomerase is the factor that allows these cells to exceed Hayflick limit and achieve immortalization.

The tissue regeneration and tumor formation seem to have as a necessary step the telomerase activation. On one hand the activation may allow for tissue renewal and consequent reversal of some effects of aging. Furthermore inhibition of telomerase may be a tool directed to cease cell division in carcinomas.

Studies in mice have shown that the promotion of telomerase is indeed a double-edged sword because when the tissue renewal is promoted at the same time oncogenesis also is. The repair of telomeres does not completely heal the damage and tear done to the cell during mitosis. During mitosis cell organelles are divided into the progeny cells. The telomerase does not repair organelles, but it can be a limiting factor upstream.

In clinical trials, the inhibition of telomerase with oligonucleotides homologous to the catalytic subunit of telomerase, in particular Imetelstat, proved promising in myelofibrosis reversal in selected patients. Despite the high hepatotoxicity, it managed to produce consistent histological remission in patients with accelerated myelofibrosis, the remission has never been achieved with other drugs.

The development of other cancer targeted therapies with improved cell penetration and distribution is expected.

The telomere and telomerase apparatus is complex, its manipulation with knock-out genes, promoting genes or use of agonists, homologous or inhibiting substances have yet no technical reproduction nor accuracy.

There is wide variation in the behavior of telomeres between individuals and between individual cells, they have poor predictive value of aging. The most consistent variations appear in cells exposed to high division rates.

Telomerase activity and telomere length is a better indicative of the rate of cell division rather than its life expectancy. The length of telomeres is a good indicator of the current state of the cell with respect to mitotic activity.

Evidence suggests that the state of shortening or lengthening of telomeres is not the cause of cell aging, but one of the consequences. Additionally shortening does not appear to be necessary for aging to exist.

The telomerase activation has been observed in approximately 90% of all human tumors, suggesting that immortality conferred by telomerase plays a key role in cancer development. I infer that the shortening of telomeres does not have an important role in cellular apoptosis, but the activation of telomerase with maintenance of telomeres appears to be important in tumor immortalization.

Telomerase is an important target in the treatment of both cancer and aging, but current methods of its modulation prove to be very inadequate.

The telomere protects the genome from recombination during cell division, this is mostly the way it protect tissues from aging and cancer.

Keywords

Telomerase Therapy

Telomere

Telomerase

Somatic cell division limit

Cancer

Aging

Hayflick's Limit

Imetelstat

Introdução

O envelhecimento e o cancro são fenómenos que andam de mãos dadas. Apesar dos casos mais dramáticos de neoplasia serem muitas vezes nas faixas etárias mais jovens, não podemos negar que existe correlação positiva entre idade e cancro.

Nesta medida o cancro e o envelhecimento tornam-se partes integrantes de um flagelo social. Ambos promovem uma fragilidade marcada que muitas vezes não encontra resposta apropriada.

O envelhecimento e o cancro têm implicações semelhantes a nível social. Encontramos, habitualmente, uma pessoa privada da força e capacidade de outrora e com uma esperança de vida reduzida quando comparada com a média populacional.

Ao nível biológico, a evidência aponta para uma semelhança entre cancro e envelhecimento. Definimos envelhecimento celular como a incapacidade de divisão somática acompanhada por perda de função (senescência celular) e definimos cancro como capacidade de divisão celular descontrolada acompanhada por perda ou alteração de função. Estes processos podem converter-se um no outro: células senescentes que ao invés de pararem a divisão celular se multiplicam freneticamente a todo o custo ou tecido neoplásico que após terapia dão lugar a tecido cicatrizado com células sem capacidade de divisão, nem função.

Os telómeros e telomerase, como parte integrante de um sistema de proteção dos cromossomas durante a divisão celular, apresentam-se como potenciais alvos terapêuticos.

Pretendo explorar a relevância do sistema telómero/telomerase na senescência celular, envelhecimento e cancro.

Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo elaborar uma revisão sobre o estado atual da arte no que se refere à aplicação clínica e terapêutica do conhecimento dos telómeros e da telomerase e dar perspetivas futuras em relação ao seu papel no envelhecimento e cancro.

Pretende-se, ajudar a clarificar até que ponto as substâncias moduladoras da telomerase podem ter um papel importante no tratamento do cancro ou dos sinais e sintomas de envelhecimento, ajudar a clarificar a relação cancro e envelhecimento e, se possível, abrir portas à investigação de medicamentos de terapia dirigida que ajudem a tornar o cancro numa doença principalmente crónica.

Do mesmo modo, a investigação de moléculas de terapia dirigida à promoção da telomerase em tecidos específicos poderá reduzir os sintomas e sinais subtis que comprometem um envelhecimento saudável.

Material e Métodos

Para a realização deste trabalho, efetuei uma pesquisa de artigos publicados nas áreas de Gerontologia, Oncologia e Geriatria indexadas na base de dados da PubMed. Utilizei a Rede Privada Virtual da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os termos de pesquisa utilizados foram “*telomerase therapy*”, “*aging theories*”, “*aging, cancer and telomerase*” e “*aging, cancer and hayflick limit*”. Não se restringiram as referências bibliográficas por idioma de publicação, tendo sido selecionados os artigos considerados relevantes para o tema.

Nesta revisão entende-se oncogénese como o processo pelo qual uma linha celular toma características cancerosas e entende-se linha celular como o conjunto de células progenitoras e descendentes geradas por sucessivas mitoses.

Entende-se envelhecimento como processo multifatorial baseado na senescência celular definida como incapacidade de a célula se dividir e executar as suas funções em pleno.

1-Definição

A telomerase, também chamada de transferase terminal de telómeros, [1] é uma ribonucleoproteína que adiciona a sequência polinucleótida "TTAGGG" à extremidade 3' dos telómeros, que se encontram nas extremidades dos cromossomas de células eucarióticas.

Os telómeros são uma região de sequências de nucleótidos repetidos em cada extremidade de um cromossoma, que protegem essa mesma extremidade da deterioração ou de fusão com cromossomas vizinhos. O seu nome é derivado dos substantivos *telos* (do grego: “fim”) e *meros* (do grego “peça”).

A sequência de nucleótidos repetida nos telómeros é transferida pela enzima telomerase: TTAGGG repetida aproximadamente 2.500 vezes num cromossoma humano. [1]

A telomerase é uma transcriptase reversa, pois transcreve nucleótidos a partir de ARN para o genoma.

Tem na sua constituição uma molécula de ARN (com o padrão de "UCCC CCCAA").

O ARN da telomerase é o molde utilizado para o alongamento do ADN dos telómeros na divisão celular. São adicionados, portanto, os nucleótidos “TTAGGG”.

Os telómeros funcionam como tampões não codificantes nas extremidades dos cromossomas, que são truncados durante a divisão celular; a sua presença protege as áreas codificantes de serem truncadas.

Ao longo de cada divisão celular, o telómero tornar-se mais curto. [2] A telomerase têm a função de repôr os telómeros. Contudo este processo pode não ser suficiente, pois células de indivíduos mais velhos demonstram ter telómeros encurtados.

2-Contexto Histórico

No início de 1970, o biólogo russo Alexei Olovnikov [3] reconheceu pela primeira vez que os cromossomas eram incapazes de replicar completamente as suas extremidades. (fig.1)

Construindo sobre a experiência de Leonard Hayflick do limite de divisão somática das células (1961), Olovnikov sugeriu que as sequências de ADN são perdidas a cada vez que uma célula se replica até que a perda atinge um nível crítico, em que a divisão celular termina. Olovnikov sugeriu a hipótese de envelhecimento e de oncogénese baseada nos telómeros, mas não possuía evidência suficiente para defender a teoria.

Durante a década de 1970 não houve reconhecimento de que o mecanismo de encurtamento dos telómeros limitaria as células a um número fixo de divisões.

Só mais tarde, em 1984, é que a telomerase foi descoberta por W. Greider e Carol Elizabeth Blackburn em estudos experimentais nos cílios do protozoa *Tetrahymena*. [4]

Juntamente com Jack Szostak, Greider e Blackburn foram agraciados com o Prémio Nobel de 2009 em Fisiologia e Medicina pela descoberta de como os cromossomas são protegidos por telómeros e pela enzima telomerase. [5]

No início do século XXI, o papel dos telómeros e da telomerase no envelhecimento celular e cancro registou alguns avanços, com o desenvolvimento da clonagem do ARN e dos componentes catalíticos da telomerase humana [6] e com o desenvolvimento de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) modificada para a medição de atividade da telomerase chamada de ensaio TRAP, que tem sido ferramenta importante para examinar a atividade da telomerase em vários tipos de cancro. [7]

A composição proteica específica da telomerase foi identificada em 2007 por Scott Cohen e sua equipa no Children's Medical Research Institute (Australia). [8] A estrutura tridimensional da subunidade catalítica da telomerase foi descodificada em alta resolução em 2008 por Emmanuel Skordalakes e sua equipa no animal *Tribolium castaneum* (Besouro Castanho). [9]

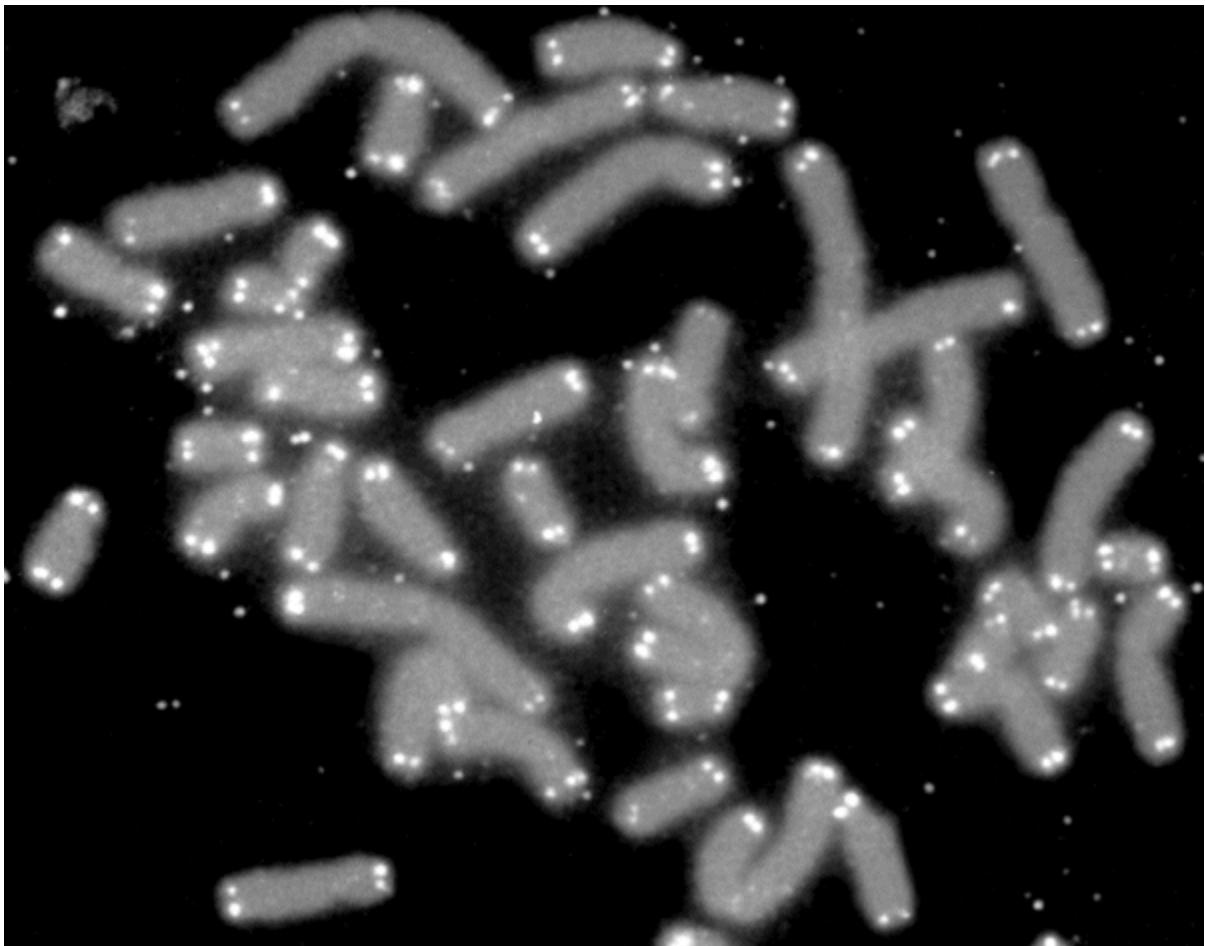


Fig. 1 Cromossomas humanos com telómeros a branco (imagem de U.S. Department of Energy Human Genome Program)

3-Estrutura da Telomerase

O complexo da enzima telomerase humana é constituído por quatro subunidades principais: duas moléculas de transcriptase reversa da telomerase (TERT), uma de ARN da telomerase (TR ou TERC) e uma disquerina (DKC1). [8] Os genes das subunidades de telomerase estão localizados em diferentes cromossomas. O gene TERT humano (hTERT) é traduzido para uma proteína de 1132 aminoácidos. [10] Este polipeptídeo dobra-se e vai acoplar a porção TERC, que contém ARN (451 nucleótidos de comprimento).

A TERT tem uma estrutura com capacidade envolvente que permite que seja moldada à volta do cromossoma para conseguir adicionar repetições numa cadeia simples de maneira a fazer manutenção dos telómeros. (fig.2)

A TERT é uma transcriptase reversa, classe essa de enzimas que gera ADN de cadeia simples utilizando um ARN de cadeia simples como um molde.

A enzima compartilha características comuns com transcriptases reversas de retrovírus, polimerases de ARN viral e polimerases de ADN de bacteriófagos de família B. [9]

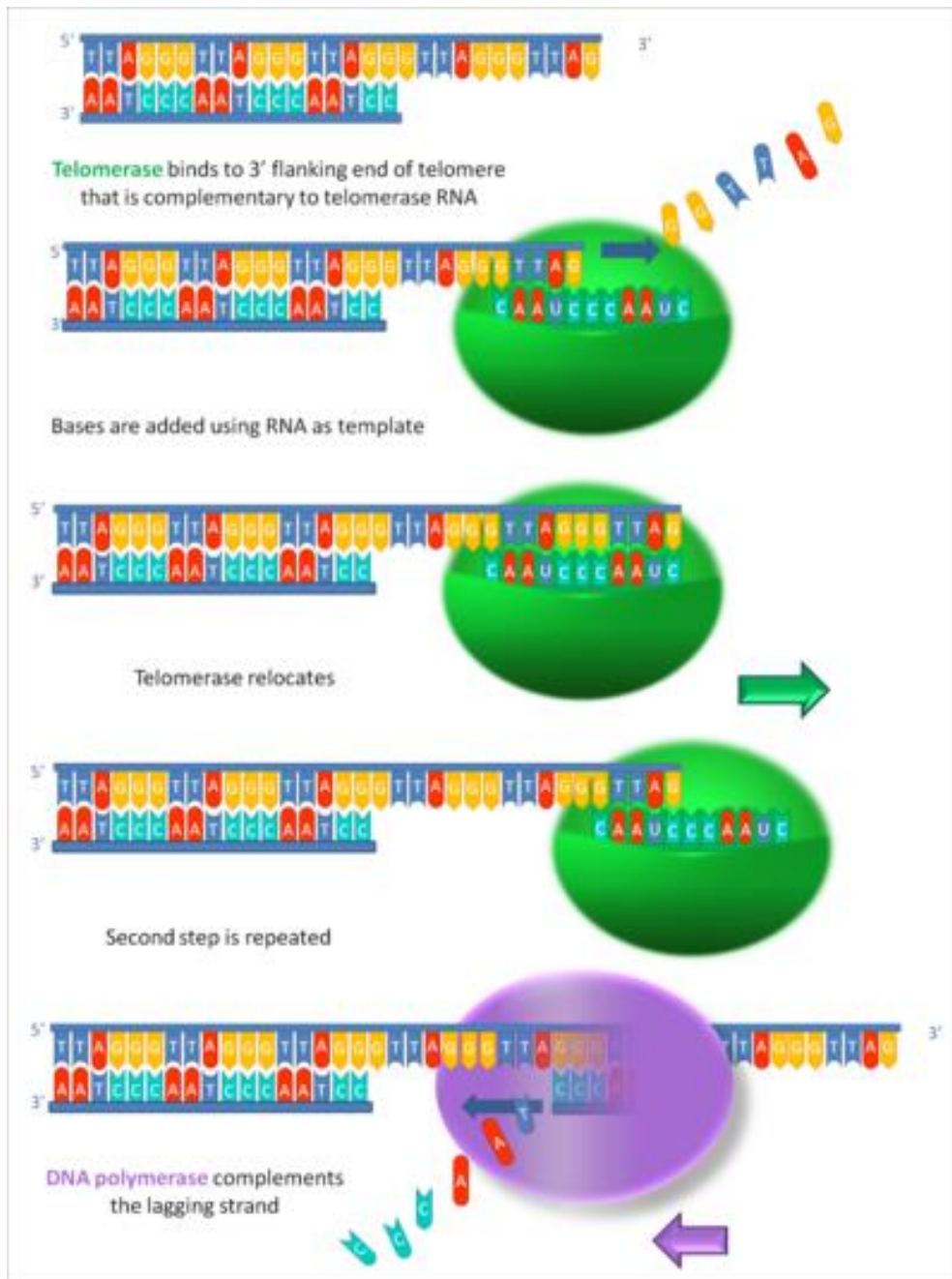


Fig.2 Imagem que ilustra como a telomerase alonga o telómero progressivamente (imagem de Uzbas, F. em Creative Commons)

4-Função da Telomerase

Ao utilizar a subunidade TERC, a TERT adiciona uma sequência repetida de seis nucleótidos, 5'-TTAGGG (a sequência difere consoante o organismo, mas é igual em todos os vertebrados) à terminação 3' dos cromossomas. Essas repetições TTAGGG são chamados telómeros, ao qual se juntam várias proteínas parceiras de ligação, que formam um complexo tampão chamado de telosoma (do grego “corpo final”) ou também chamado de shelterina. O molde de ARN da subunidade TERC é 3'-CAAUCCCAAUC-5'. [11]

Para iniciar o processo de polimerização, a telomerase vincula os primeiros nucleótidos da TERC aos últimos da sequência do telómero no cromossoma. De seguida adiciona uma nova sequência (5'-GGTTAG-3'), desfaz a ligação, realinha a nova extremidade e repete o processo.

Desta forma a telomerase inverte o encurtamento do telómero (fig.3).

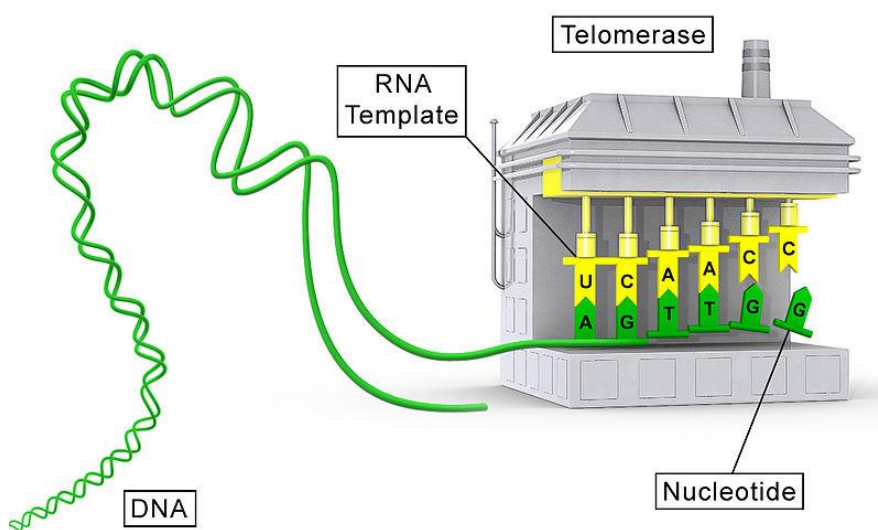


Fig.3 Ilustração da molécula telomerase (imagem de Sierra Sciences LLC)

5-Telomerase e Envelhecimento

O encurtamento dos telómeros é das teorias determinísticas do envelhecimento mais aceites e difundidas na comunidade científica. Ela explica em parte o limite da divisão somática de uma célula. Contudo o processo de envelhecimento afeta mais sistemas moleculares do que apenas os telómeros.

Em circunstâncias normais de cultura se uma célula se dividir de forma recursiva, em algum momento a sua descendência vai atingir o limite de Hayflick. [12] Este limite está estipulado ser entre 50-70 divisões celulares. Atingindo o limite as células tornam-se senescentes e param de se dividir. [13] A telomerase permite à descendência celular repôr o ADN perdido, possibilitando que a linha celular se divida sem nunca atingir o limite. Este crescimento ilimitado é, também, característico do crescimento maligno. [14]

As células estaminais embrionárias expressam telomerase, o que lhes confere um alto poder de divisão, certamente ultrapassando as 50 a 70 divisões propostas, isto explica a capacidade de gerarem um indivíduo composto de inúmeras linhas celulares diferentes.

Nos adultos, a telomerase é altamente expressa apenas em células que precisem de se dividir regularmente: células germinais masculinas, mas também nos linfócitos ativados e certas células estaminais adultas, ao passo que a maior parte das células somáticas não a expressa. [15]

A respeito do envelhecimento, um estudo de biologia comparativa entre mamíferos indicou que o comprimento dos telómeros de algumas espécies de mamíferos se correlaciona inversamente, ao invés de diretamente, com a expectativa de vida. Foi concluído que a contribuição do comprimento dos telómeros na expectativa de vida não está resolvida. [16]

Em alguns tecidos pós-mitóticos, tal como no cérebro de rato (e por extrapolação no cérebro humano) o encurtamento dos telómeros não ocorre com a idade. [17]

Da mesma forma, em humanos, o comprimento dos telómeros do músculo esquelético parece permanecer estável entre pelo menos as idades de 23 a 74 anos. [18]

Outra experiência feita com músculo esquelético de babuíno velhos, mostrou menos de 3% de núcleos de miócitos que continham telómeros encurtados. [19]

No fígado humano, células epiteliais das vias biliares e hepatócitos não mostraram nenhum encurtamento dos telómeros relacionado com a idade. [20]

Um outro estudo encontrou poucas evidências que, em humanos, o comprimento dos telómeros fosse um biomarcador importante do envelhecimento no que diz respeito às habilidades cognitivas e físicas. [21]

Destes estudos infiro que no envelhecimento a atividade da telomerase é mais importante do que o comprimento efetivo dos telómeros. O encurtamento dos telómeros existe em tecidos submetidos a uma grande carga mitótica, fenómeno que é residual no tecido encefálico classicamente descrito como tendo baixa taxa de proliferação.

O encurtamento dos telómeros parece não ser uma medida linear do envelhecimento em células diferenciadas, ou também chamadas de pós-mitóticas, como os neurónios e miócitos. Este tipo de tecidos está descrito como largamente incapaz de regeneração ou proliferação eficiente após dano, o que implica uma taxa mitótica muito baixa e pode explicar a preservação dos telómeros durante a maior parte do ciclo de vida.

O potencial dos telómeros para o diagnóstico de envelhecimento é fraco, porque o telómero mantém-se largamente intacto até aos extremos etários.

O envelhecimento é um processo multifatorial e os telómeros são parte da dinâmica de um organismo multicelular. Não devem ser vistos como limitadores ou potenciadores de uma vida longa mas sim como protetores do genoma durante a divisão celular.

Estudos recentes realizados em outras espécies reforçam que a relação entre telómeros e envelhecimento está atualmente menos bem estabelecida do que inicialmente se pensava:

Em 2003, cientistas observaram que os telómeros de aves marinhas de vida longa (*Oceanodroma leucorhoa*) aumentavam com a idade cronológica. [22]

Em 2006, Juola et al. [23] relatou que na ave marinha, (*Fregata minor*), o comprimento dos telómeros diminuía durante os 40 anos de vida da espécie, mas a velocidade de queda abrandava maciçamente com idades crescentes, e que as taxas de redução comprimento dos telómeros variavam muito entre as aves individuais e provavelmente de célula para célula.

Além disso, Gomes et al. encontrou num estudo de biologia comparativa de mamíferos, que o comprimento dos telómeros de diferentes espécies se correlacionava inversamente, ao invés de diretamente, com a expectativa de vida. [24]

Harris et al. que encontrou pouca evidência de que, em humanos, o comprimento dos telómeros seja um biomarcador importante do envelhecimento normal no que diz respeito às habilidades cognitivas e físicas importantes. [25]

Gilley e Blackburn testaram se a senescência celular no protozoário paramécio é causada pelo encurtamento dos telómeros, e descobriram que os telómeros não foram encurtados durante a senescência. [26]

Estes estudos concluíram que o comprimento dos telómeros não poderia ser usado para determinar a idade, devido à variabilidade entre organismos e entre células, assim como à não linearidade da sua redução.

Existe uma grande variação no comportamento dos telómeros, eles têm fraco valor preditivo no envelhecimento. Infiro que as variações mais consistentes aparecem em células expostas a grande taxa de divisão.

Talvez a atividade da telomerase e comprimento dos telómeros seja mais indicativo da taxa de divisão de uma célula e não da expectativa de vida do organismo.

Todas estas evidências sugerem que o estado de encurtamento ou alongamento dos telómeros não é a causa do envelhecimento celular, mas sim uma consequência. Adicionalmente o encurtamento parece não ser necessário para que haja envelhecimento.

O comprimento dos telómeros não é um bom marcador da idade da célula. Penso que seja, sim, um bom indicador do estado atual da célula no que diz respeito à atividade mitótica.

5.1 Perspetivas de Tratamento do Envelhecimento

Experiências onde o componente catalítico da telomerase foi clonado de modo a ativar a telomerase mostraram a capacidade de imortalizar células humanas em cultura. Este estudo foi publicado em 1998, na revista Science. [27]

Levantou-se a questão se a telomerase poderia ser um elixir da vida eterna, ou pelo menos poderia ajudar a combater doenças de carácter degenerativo.

É lógico que inverter o encurtamento dos telómeros através da ativação da telomerase seria uma ferramenta potente para retardar os efeitos do envelhecimento, contudo os estudos experimentais não suportaram esta hipótese.

Prolongar a vida humana através do *bypass* do limite de Hayflick é um objetivo coerente.

Três maneiras foram propostas para inverter encurtamento dos telómeros:

-fármacos (anticorpos, nucleótidos e pequenas moléculas)

-terapia génica

-supressão metabólica (restrição calórica ou hibernação).

Foi demonstrado que o encurtamento do telómero é revertido em hibernação (Turbill, et al. 2012 e 2013) e que a hibernação prolonga vida útil (Lyman et al. 1981).

Em 2002, Weinstein e Ciszek levantaram a hipótese de que telómeros mais longos e, especialmente, a ativação da telomerase podem provocar um aumento da incidência de cancro.

[28]

Um estudo mostrou que ratinhos com níveis elevados de telomerase tinham maior incidência do cancro e, portanto, não viviam mais tempo. A telomerase parece assim favorecer a tumorigénese/oncogénese, o que levanta perguntas sobre o seu potencial como uma terapia de anti-envelhecimento. [29]

Por outro lado, outro estudo mostrou que a ativação da telomerase em ratinhos, promovendo a sobre expressão a subunidade catalítica da telomerase, provocou aumento da sobrevida. [30] Contudo este estudo teve como população ratinhos tornados doentes previamente.

Ratinhos com deleção do gene que produz a telomerase mostraram envelhecimento a uma taxa muito mais rápida, morreram em cerca de seis meses em vez de chegar ao tempo de vida média, cerca de três anos. Fazendo-se o “knock-in” genético este efeito conseguiu ser revertido não só na geração seguinte de ratinhos como também nos mesmos indivíduos. [31]

Um estudo de 2012 relatou que a introdução do gene TERT em ratinhos saudáveis com um ano de idade, usando um vetor de adenovírus levou a um aumento de 24% no tempo de vida, sem qualquer aumento no cancro. [32]

De notar que estas investigações com resultados mais promissores são financiadas por empresas de biotecnologia onde poderá haver conflito de interesses.

Estes estudos embora contraditórios parecem confirmar a relevância da telomerase no processo da oncogénese, na sua supressão, no controlo da senescência e da proliferação celular.

O aparato telómero e telomerase é complexo, a sua manipulação com knock-out, promoção de genes ou uso de substâncias agonistas, homólogas ou inibidoras carece ainda de reprodução técnica e rigor.

Em cultura apenas os nucleótidos e a terapia génica mostraram capacidade de imortalizar as células.

Os anticorpos testados possuem eficácia questionável.

Ainda não existem pequenas moléculas com atividade sobre a telomerase.

A supressão metabólica não farmacológica com restrição calórica ou hibernação foram os únicos que mostraram aumento da sobrevida em organismos.

A supressão metabólica farmacológica é talvez o mecanismo utilizado por diversos fármacos atualmente disponíveis (por exemplo as Estatinas, anti-diabéticos e quimioterápicos).

Muitas destas ideias não foram comprovadas como úteis em humanos, ou sequer experimentadas. Uma das dificuldades da regeneração com telomerase é que durante a mitose os organelos celulares são divididos pelas células descendentes. A telomerase não repara os organelos.

O estudo da telomerase tem entusiasmado cientistas não apenas no envelhecimento mas também em áreas afetadas por degenerescência celular específica.

Num estudo foi feita exposição de linfócitos T de dadores humanos infetados pelo HIV a uma molécula ativadora da telomerase (TAT2). O resultado mostrou retardamento do encurtamento dos telómeros, e mais importante, mostrou um aumento do potencial proliferativo e aumento da produção de citocinas, quimiocinas e da atividade antiviral destes linfócitos. [33]

Este estudo revela que a telomerase poderá ser importante para promover a divisão de uma linha celular senescente (neste caso linfócitos CD4+ infetados por HIV).

Outro estudo que incidiu sobre os judeus ashkenazi descobriu que os indivíduos de vida longa herdaram uma versão hiperativa da telomerase. [34] Este é um estudo promissor feito com base na medição da atividade da telomerase por PCR chamado ensaio TRAP. A TRAP é uma tecnologia pouco difundida, dispendiosa e com utilidade em estudo.

Adicionalmente, em síndromes de envelhecimento precoce incluindo a síndrome de Werner, Ataxia-Telangiectasia, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e síndrome de Nijmegen estão associados a telómeros curtos. [35] No entanto, os genes mutados nestas doenças têm um papel também na reparação dos danos do ADN e o aumento do dano pode, ele próprio, ser um fator no envelhecimento prematuro, relegando os telómeros para um papel secundário. Tentar manter o comprimento dos telómeros nestas doenças é uma área ativa de investigação.

O telómero é uma estrutura nobre do cromossoma, ele protege o genoma de recombinações durante a divisão celular, é sobretudo desta forma que o telómero nos protege do envelhecimento. Podemos observar na figura 4 (fig.4) a disposição em ansa de “D” e ansa de “T” das duas cadeias, formando um “nó protetor”.

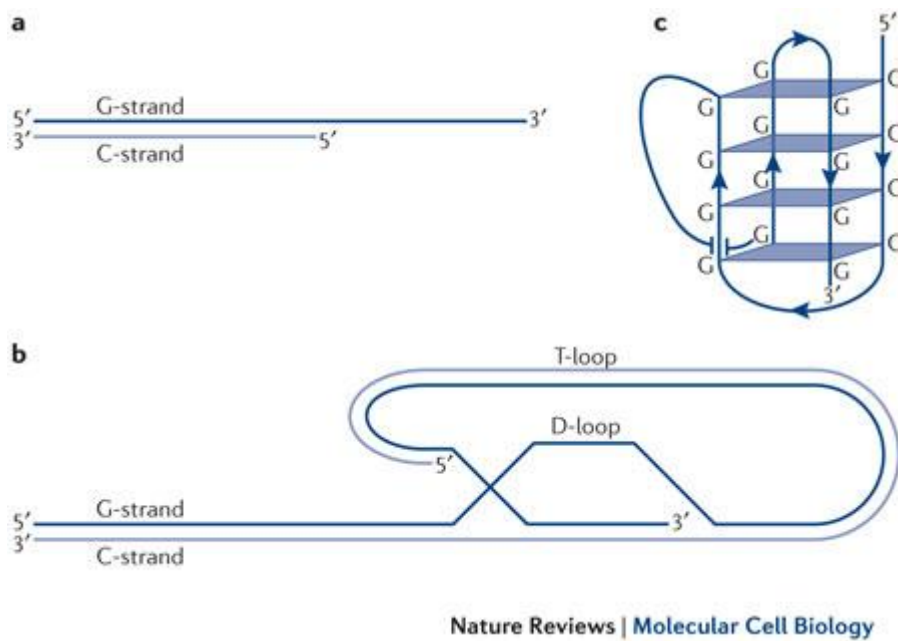


Fig. 4 Telómero com a terminação “T-Loop” (imagem de Nature Reviews – Molecular Cell Biology)

6-Telomerase e Cancro

In vitro, quando as células se aproximam do limite de Hayflick, o tempo para a senescência pode ser estendido por inativação das proteínas supressoras tumorais (P53 e proteína do retinoblastoma (pRb)). Estas células alteradas, eventualmente, alcançam um evento denominado de "crise". A maioria das células em cultura morrem, mesmo tendo os genes supressores tumorais inibidos. Contudo, uma pequena parte das células não para a divisão. Pensa-se que esta pequena população resistente seja a génese de muitos cancros.

Numa situação típica sem atividade da telomerase os telómeros são encurtados [36] e a integridade cromossómica diminui com cada divisão celular subsequente. As extremidades expostas dos cromossomas são interpretadas como quebras de cadeia dupla (DSB) no ADN.

Acredita-se que tal dano é reparado com a ligação das pontas partidas dos cromossomas formando ansa em "T" e "D". Contudo quando a célula faz isto devido ao encurtamento dos telómeros, é possível que as extremidades dos diferentes cromossomas se liguem umas às outras.

Este fenómeno pode traduzir-se num alongamento alternativo dos telómeros, independente da telomerase. Faz-se "bypass" ao controlo proliferativo.

Tal achado mostra que os genes supressores tumorais têm um papel inter cruzado com os telómeros no controlo da divisão celular.

A divisão celular provoca stress no genoma da célula. Durante a anafase, na disjunção cromossómica, os cromossomas com ligações entre si são separados aleatoriamente. Daqui podem resultar mutações e anomalias cromossómicas na geração seguinte. O genoma da célula pode tornar-se instável. Eventualmente, um dano fatal é feito ao genoma promovendo a

apoptose ou, alternativamente, a célula passa a transcrever um grupo específico de genes que permitem a sua sobrevivência nestas condições deficitárias. Acredito que estes genes fundamentais para a sobrevivência da célula com um genoma danificado sejam um tipo de oncogenes.

O encurtamento dos telómeros não é o fator essencial para promover a apoptose de uma célula senescente, os genes supressores tumorais e de apoptose são fundamentais nessa função.

Por isto, em teoria, a telomerase sozinha pode mostrar-se insuficiente para imortalizar uma célula, pois além da conservação dos telómeros a célula necessita de promoção de certos genes para atingir a imortalização. Os mecanismos por de trás da imortalização maligna e da capacidade extraordinária de divisão das células estaminais continuam em estudo.

No que diz respeito ao cancro é notável a quantidade de células com alta atividade da telomerase.

Desde que estejam reunidas as condições para a sua duplicação, a ativação da telomerase torna alguns tipos de células e seus descendentes imortais (bypass do limite de Hayflick).

Muitas células malignas são consideradas "imortais", porque a atividade da telomerase lhes permite dividir indefinidamente, razão pela qual adquirem uma vantagem competitiva face às outras células.

Um bom exemplo, largamente estudado de células malignas imortais são as células HeLa. Elas têm sido usadas em todo o mundo como uma linha de células modelo desde 1951, estas células foram colhidas de um único tumor do colo uterino da doente Henrietta Lacks e mostram capacidades proliferativas excepcionais nunca dantes observadas. Foram usadas na criação da vacina contra poliomielite, no mapeamento de genoma humano e continuam a ser amplamente usadas em diversas investigações.

As alterações exatas que permitem a formação de clones oncogénicos na linha celular acima descrita não são claras. Alguns biólogos chegaram a propor classificar estas células como uma nova espécie. Estima-se que a cultura desta linha celular tenha atingido 20 toneladas desde 1951 até hoje. [36]

Este acontecimento foi documentado no livro “The Immortal Life of Henrietta Lacks” escrito por Skloot, Rebecca (2010).

A identificação de combinações de mutações que se formam em células imortais é incerta. Embora as combinações variem com o tipo celular, as seguintes alterações parecem ser necessárias em todos os casos: ativação TERT, perda de função da via p53, a perda de função da via pRb, a ativação dos proto-oncogenes Ras ou myc e a aberração da proteína fosfatase PP2A.

Ou seja, a célula tumoral tem: a telomerase ativa, eliminando o processo de morte pela instabilidade cromossómica ou perda cromossómica, tem ausência de vias de apoptose e possui ativação contínua de mitose à custa de oncogenes.

Este modelo de cancro em cultura descreve com exatidão o papel da telomerase em tumores humanos reais. A ativação da telomerase tem sido observada em cerca de 90% de todos os tumores humanos [37], o que sugere que a imortalidade conferida pela telomerase desempenha um papel chave no desenvolvimento do cancro.

Fica claro que o encurtamento dos telómeros não têm um papel muito relevante na apoptose celular, mas a ativação das telomerases com manutenção dos telómeros parece ser importante na imortalização tumoral.

Existem tumores sem ativação da telomerase (TERT), cerca de 10%. [38] Estes tumores empregam um método diferente para manter o comprimento dos telómeros denominado Alongamento Alternativo dos Telómeros (ALT). [39] O mecanismo exato por trás desta

manutenção da via ALT não é claro, mas provavelmente envolve vários eventos de recombinação cromossómica envolvendo o telómero.

Elizabeth Blackburn et al. identificou 70 genes presumidos no crescimento e propagação do cancro e na ativação da glicólise, que permite que as células malignas possam usar rapidamente o açúcar para facilitar a sua taxa de crescimento (aproximadamente a taxa de crescimento de um feto). [40]

Abordagens dirigidas no controlo da telomerase e telómeros para a terapia do cancro incluem a terapia génica, imunoterapia e pequenas moléculas inibidores da via sinalizadora. [41]

Os telómeros são fundamentais para a manutenção da integridade genómica e os estudos mostram que a disfunção dos telómeros ou encurtamento é comumente adquirida durante o processo de desenvolvimento do tumor. [42]

Telómeros curtos podem levar à instabilidade genómica, à perda ou fusão cromossómica e à formação de translocações não recíprocas.

Um estudo mostrou que os telómeros em células tumorais e nas suas lesões precursoras são significativamente mais curtos do que o tecido normal circundante. [43,44]

Estudos observacionais têm encontrado telómeros mais curtos em muitos tipos de cancro, incluindo: pâncreas, osso, próstata, bexiga, pulmão, rim, cabeça e pescoço.

Além disso, doentes com vários tipos de cancro mostraram possuir leucócitos com telómeros mais curtos do que os controlos saudáveis. [45]

Uma meta-análises recente sugere 1.4-3.0 vezes mais de risco de cancro para aqueles com telómeros menores. [46,47]

No entanto, o aumento do risco varia de acordo com idade, sexo, tipo de tumor e diferenças de fatores de estilo de vida. Estes estudos também não possuem a dimensão suficiente para afirmar que telómeros curtos significam risco aumentado de cancro.

Alguns dos mesmos fatores de estilo de vida que aumentam o risco de desenvolver cancro também têm sido associados com telómeros mais curtos: incluindo o stress, tabagismo, inatividade física e dieta rica em açúcares refinados. [47]

Dieta e atividade física influenciam inflamação e stresse oxidativo. Estes fatores poderão influenciar a manutenção dos telómeros. [48]

Stress psicológico também tem sido associado com o envelhecimento celular acelerado, talvez refletido pela diminuição da atividade de telomerase e telómeros curtos. [49]

Foi sugerido que uma combinação de modificações do estilo de vida, incluindo a dieta saudável, exercício e redução do stress, têm o potencial de aumentar o comprimento dos telómeros, reverter o envelhecimento celular e reduzir o risco de doenças relacionadas com o envelhecimento.

Num recente ensaio clínico para pacientes com cancro da próstata em estadio inicial, as mudanças de estilo de vida resultaram num rápido aumento da atividade da telomerase. [50,51]

Talvez as modificações de estilo de vida têm o potencial para induzir naturalmente a telomerase sem promover a oncogénese, como parece acontecer em ensaios de ativação da telomerase.

Estes resultados mostram efetivamente a melhoria da esperança de vida com as modificações do estilo de vida. Contudo será precipitado atribuir estes efeitos unicamente à atividade da telomerase.

Como foi dito anteriormente, a telomerase está ativa em aproximadamente 80-90% dos tumores. [52] No entanto, uma fração considerável de células malignas emprega alongamento alternativo dos telómeros (ALT) [53]. A ALT é uma via alternativa de alongamento que envolve a transferência de telómeros entre cromatídeos. [53]

A telomerase é uma enzima natural que promove a reparação dos telómeros. Ela está ativa em células estaminais, células germinativas, folículos pilosos e 80-90% das células malignas. A sua expressão é reduzida ou ausente em células somáticas. Estes dados reforçam o potencial de criação de terapêuticas dirigidas.

A telomerase poderá ser um bom marcador tumoral porque a maioria das células cancerígenas expressam altos níveis. A atividade da telomerase pode ser identificada pelo seu domínio catalítico proteico (hTERT). [54]

Os tumores e fibroblastos (células produtoras de matriz extra-celular, importantes na cicatrização) têm alta atividade da telomerase.

As células estaminais epiteliais e sua descendência inicial são as únicas células não malignas em que a atividade da TERT pode ser detetada.

Um estudo afirmou uma vez que a expressão da TERT é apenas dependente do número de células tumorais dentro de uma amostra, a quantidade de TERT pode indicar a gravidade de um cancro. [55]

A expressão de TERT foi estudada como potencial ferramenta para distinguir tumores benignos de tumores malignos. Os tumores malignos têm expressão de TERT maior do que os tumores benignos. Resultados aferidos por TRAP. [56]

Ainda não foram efetuados estudos independentes para avaliar o papel da atividade da TERT no diagnóstico e prognóstico de tumores.

A falta de telomerase não afeta o crescimento celular, até que os telómeros encurtem o suficiente para levar as células a entrarem em “crise”. Mesmo assim, ao contrário das células senescentes ou envelhecidas, as células tumorais têm mecanismos alternativos de alongamento de telómeros (ALT), que permitem a sucessiva divisão. Por isso a terapia dirigida à telomerase será sempre melhor empregue em conjunto com cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia ou outras alternativas.

6.1-Fármacos Dirigidos

Crê-se que as células com a atividade da telomerase são consideradas imortais no sentido de que elas podem dividir-se além do limite de Hayflick sem entrar senescência ou apoptose. Por esta razão, a telomerase é vista como um alvo potencial para fármacos oncológicos (tal como Imetelstat e Telomestatin). [57]

Estudos utilizando ratinhos *knockout* têm demonstrado que a função dos telómeros no cancro pode ser limitante para o crescimento do tumor, assim como promover a oncogénese, dependendo do tipo de célula e contexto genómico. [58,59]

É inconclusivo se a telomerase tem um efeito deletério ou benéfico na prevenção e tratamento do cancro e envelhecimento. Contudo é claro que tem um papel central nesta dinâmica.

A criação de substâncias que sejam eficazes na modelação da atividade da telomerase torna-se objetivo a atingir para a progressão desta área.

Como vimos com as células HeLa, a capacidade para manter os telómeros e a telomerase funcionais pode ser um mecanismo que permite que as células malignas cresçam *in vitro* ao longo de décadas. [60]

A atividade da telomerase é necessária para preservar vários tipos de cancro. Contudo ela é largamente inativa em células somáticas.

Isto cria a possibilidade de que a inibição da telomerase pode reprimir seletivamente o crescimento do cancro com efeitos secundários mínimos. [61]

Se um fármaco puder inibir a telomerase em células malignas, os telómeros de gerações sucessivas vão progressivamente reduzir, limitando o crescimento de tumores. [62]

Contudo o encurtamento dos telómeros pode não ser 100% eficaz na repressão do crescimento tumoral, porque algumas células encontram rapidamente métodos de Alongamento Alternativo dos Telómeros, normalmente mediados por recombinações cromossómicas, formando genomas altamente aberrantes.

Do ponto de vista racional os telómeros curtos podem não ser um inibidor completo do crescimento tumoral, pois a função principal dos telómeros é a proteção cromossómica. Nas células tumorais a proteção cromossómica foi já há muito descorada, pois elas têm uma capacidade de resistir ao dano cromossómico superior a uma célula normal. Não obstante, um estudo mostrou que a redução de apenas 50 a 252 pares de bases teloméricas por divisão celular, pode conduzir a uma fase de latência longa. [63,64]

A inibição da telomerase por si só não é suficiente para destruir tumores grandes. Deve ser combinada com cirurgia, radiação, quimioterapia ou imunoterapia. [65] É destacada assim a importância do tratamento crónico e a abordagem de controlo versus a cura.

A criação de fármacos inibidores das telomerasas tem vindo a revelar-se muito insuficiente. Imetelstat e Telomestatin são os exemplos mais relevantes.

Telomestatin é um composto químico macrocíclico que atua por inibição da atividade de telomerase das células cancerosas. Foi isolado pela primeira vez, em 2001 a partir de bactérias *Streptomyces anulatus*. Contudo o seu perfil de toxicidade nunca permitiu avançar para ensaios clínicos. [63]

O Imetelstat é um exemplo mais recente, concebido com uma filosofia racional, é feito à base de componentes oligonucleicos clonados de telomerase acoplados a extensões lipídicas de modo a penetrar nas células. Apesar da sua hepatotoxicidade e mielosupressão mostrou ser eficaz em neoplasias hematológicas.

Em 2014, após preocupações levantadas pela FDA sobre hepatotoxicidade, a Geron Corporation, criadora do Imetelstat, recebeu permissão para iniciar os ensaios. [66,67]

O Imetelstat (GRN163L) liga-se diretamente ao molde de ARN da telomerase, inibindo sua ação. Em 2015 um estudo relatou que o Imetelstat permitiu remissão parcial ou completa em 7 de 33 pacientes com mielofibrose. Um segundo relato mostrou controlo dos níveis plaquetários em 18 pacientes com trombocitémia essencial. [68]

Estes estudos mostram que a inibição da telomerase será eficaz quando há proliferação clonal hematopoiética de células mais ou menos bem diferenciadas, em contraposição os resultados provavelmente serão menos promissores em cancros sólidos de alto grau ou baixa diferenciação.

Tumores de alto grau talvez adquirem facilmente métodos de alongamento alternativo dos telómeros.

6.2-Imunoterapia

Imunoterapia controla com sucesso alguns tipos de cancro, um exemplo notável é o melanoma. Este tratamento baseia-se na apresentação de epitopos malignos ao sistema imunitário para que este destrua ou contenha as células malignas. A TERT, como muitas outras moléculas que têm vindo a ser descobertas, é um antígeno alvo potencial para imunoterapia no cancro. [69]

Duas vacinas de telomerase foram desenvolvidas no contexto de imunoterapia e terapia celular: GRNVAC1 e GV1001.

A vacina GRNVAC1 é feita com base em células dendríticas e ARN que codifica a proteína de telomerase. É administrada no doente na tentativa de ativar as células T citotóxicas contra as células tumorais ricas em ARN de telomerase (fig.5).

A vacina GV1001 é homóloga do local ativo da TERT e é administrada na tentativa de sensibilizar o sistema imunitário às células “telomerase ativas”. [70]

A imunoterapia dirigida à telomerase poderá ser uma base do tratamento do cancro. São necessários mais estudos para definir a sua utilidade.

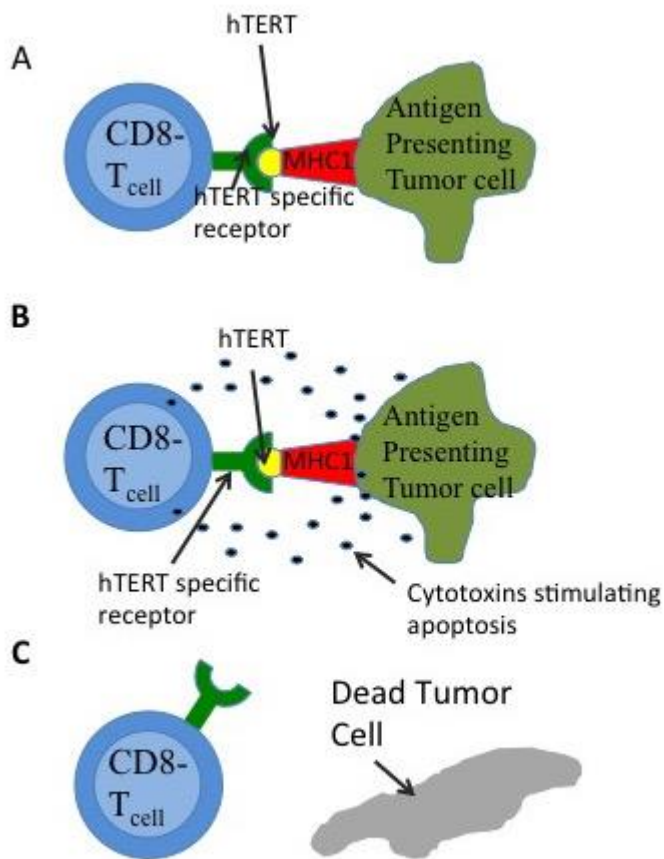


Fig.5 Esquema do papel da célula T na imunoterapia dirigida. (imagem de Nith117 in Creative Commons)

Conclusão

Nos adultos, a telomerase é altamente expressa apenas em células que precisem de se dividir regularmente: células germinais masculinas, mas também nos linfócitos ativados e certas células estaminais adultas, ao passo que a maior parte das células somáticas não a expressa.

O comprimento dos telómeros de algumas espécies de mamíferos correlaciona-se inversamente, ao invés de diretamente, com a expectativa de vida. Foi concluído que a contribuição do comprimento dos telómeros na expectativa de vida não está resolvida.

Em alguns tecidos pós-mitóticos, tal como no cérebro de rato (e por extrapolação no cérebro humano) o encurtamento dos telómeros não ocorre com a idade. Da mesma forma, em humanos, o comprimento dos telómeros do músculo esquelético parece permanecer estável entre pelo menos as idades de 23 a 74 anos. No fígado humano, as células epiteliais das vias biliares e hepatócitos não mostraram nenhum encurtamento dos telómeros relacionado com a idade.

O encurtamento dos telómeros parece não acontecer de maneira relevante em células diferenciadas e com baixa taxa mitótica.

O comprimento dos telómeros não é bom marcador da idade de uma célula. Existe uma grande variação no comportamento dos telómeros, eles têm fraco valor preditivo no envelhecimento. Variam entre indivíduos da mesma espécie e células do mesmo organismo.

Os telómeros não devem ser vistos como limitadores ou potenciadores de uma vida longa mas sim como protetores do genoma durante a divisão celular. Adicionalmente o encurtamento telomérico parece não ser necessário para que haja envelhecimento.

O aparato telómero e telomerase é complexo, a sua manipulação com knock-out, promoção de genes ou uso de substâncias agonistas, homólogas ou inibidoras carece ainda de reprodução técnica e rigor.

Em cultura apenas os nucleótidos e a terapia génica mostraram capacidade de imortalizar as células. Os anticorpos e imunoterapia testados possuem eficácia questionável. Ainda não existem pequenas moléculas com atividade seletiva sobre a telomerase. A supressão metabólica não farmacológica com restrição calórica ou hibernação foram os únicos que mostraram aumento da sobrevida em organismos saudáveis. A supressão metabólica farmacológica é talvez o mecanismo utilizado por diversos fármacos atualmente disponíveis (por exemplo as Estatinas, anti-diabéticos e quimioterápicos).

Saliento dois estudos promissores feitos com telomerase.

Num estudo foi feita exposição de linfócitos T de dadores humanos infetados pelo HIV a uma molécula ativadora da telomerase (TAT2). O resultado mostrou retardamento do encurtamento dos telómeros, e mais importante, mostrou um aumento do potencial proliferativo e aumento da produção de citocinas, quimiocinas e da atividade antiviral destes linfócitos.

Em 2015 um estudo relatou que o Imetelstat (oligonucleotídeo análogo da TERT acoplado a uma porção lipídica que inibe a telomerase) permitiu remissão parcial ou completa em 7 de 33 pacientes com mielofibrose, algo nunca antes conseguido com qualquer outro fármaco. Um segundo relato mostrou controlo dos níveis plaquetários em 18 pacientes com trombocitémia essencial.

Em teoria, a telomerase sozinha pode mostrar-se insuficiente para imortalizar uma célula, pois além da conservação dos telómeros a célula necessita de promoção de certos genes para atingir a imortalização (oncogenes). Os mecanismos por de trás da imortalização maligna e da capacidade extraordinária de divisão das células estaminais continuam em estudo.

No que diz respeito ao cancro é notável a quantidade de células com alta atividade da telomerase (cerca de 90% dos cancros exibem atividade).

O encurtamento dos telómeros não têm um papel muito relevante na apoptose celular, mas a ativação das telomerasas com manutenção dos telómeros parece ser necessária na imortalização tumoral. A inativação da telomerase nestas células tornar-se-á um pilar na terapia do cancro em conjunto com outras modalidades terapêuticas.

Referências Bibliográficas

1. “What are telomeres and telomerase?” por Shay Wright (UTSouthWestern) em http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/intro/facts/sw_facts.html
2. Greider CW, Blackburn EH (December 1985). “Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts”. *Cell* **43** (2 Pt 1): 405–13.
3. Olovnikov AM (September 1973). “A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon”. *J. Theor. Biol.* **41** (1): 181–90.
4. Greider CW, Blackburn EH (December 1985). “Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts”. *Cell* **43** (2 Pt 1): 405–13.
5. “The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009”. The Nobel Foundation. 2009-10-05. Retrieved 2010-10-23.
6. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J (September 1995). “The RNA component of human telomerase”. *Science* **269** (5228): 1236–41.
7. Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K.; Harley, C.; West, M.; Ho, P.; Coviello, G.; Wright, W.; Weinrich, S. (1994). “Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer”. *Science* **266** (5193): 2011–5.
8. Cohen S, Graham M, Lovrecz G, Bache N, Robinson P, Reddel R (2007). “Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells”. *Science* **315** (5820): 1850–3.
9. Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E (October 2008). “Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT”. *Nature* **455** (7213): 633–7.
10. National Center for Biotechnology Information (NCBI) – telomerase reverse transcriptase isoform I
11. Gavory G, Farrow M, Balasubramanian S (October 2002). “Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity in vitro”. *Nucleic Acids Res.* **30** (20): 4470–80.
12. Hayflick L, Moorhead PS (1961). “The serial cultivation of human diploid cell strains”. *Exp Cell Res* **25** (3): 585–621.
13. Siegel, L (2013). Are Telomeres the Key to Aging and Cancer? The University of Utah. Retrieved 30 September 2013
14. Hanahan D & Weinberg RA (March 2011). “Hallmarks of cancer: the next generation”. *Cell* **144** (5): 646–74.
15. Cong YS (2002). “Human Telomerase and Its Regulation”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66** (3): 407–425.
16. Gomes, NM; Ryder, OA; Houck, ML; Charter, SJ; Walker, W.; Forsyth, NR; Austad, SN; Venditti, C; Pagel, M; Shay, JW; Wright, WE (2011). “Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination.” *Aging Cell* **105** (5): 761–768.

17. Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN (2003). "Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening". *Nucleic Acids Res* 31 (5): 1576–1583.
18. "Regenerative potential of human skeletal muscle during aging." *Aging Cell* 1 (2): 132–9. Dec 2002.
19. Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U (2007). "Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates". *Mech Ageing Dev* 128 (1): 36–44.
20. Verma S, Tachtatzis P, Penrhyn-Lowe S, Scarpini C, Jurk D, Von Zglinicki T, Coleman N, Alexander GJ (2012). "Sustained telomere length in hepatocytes and cholangiocytes with increasing age in normal liver". *Hepatology* 56 (4): 1510–1520.
21. "Telomere length and aging biomarkers in 70-year-olds: the Lothian Birth Cohort 1936." *Neurobiol Aging* 33 (7): 1486.e3–8. Jul 2012.
22. Nakagawa S, Gemmell NJ, Burke T; Gemmell; Burke (September 2004). "Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations". *Mol. Ecol.* 13 (9): 2523–33.
23. Juola, Frans A; Haussmann, Mark F; Dearborn, Donald C; Vleck, Carol M (2006). "Telomere shortening in a long-lived marine bird: Cross-sectional analysis and test of an aging tool". *The Auk* 123 (3): 775.
24. Gomes, NM; Ryder, OA; Houck, ML; Charter, SJ; Walker, W; Forsyth, NR; Austad, SN; Venditti, C; Pagel, M; Shay, JW; Wright, WE (2011). "Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination". *Aging Cell* 10 (5): 761–768.
25. Harris, SE; Martin-Ruiz, C; von Zglinicki, T; Starr, JM; Deary, IJ (2010). "Telomere length and aging biomarkers in 70-year-olds: the Lothian Birth Cohort 1936". *Neurobiol Aging* 33 (7): 1486.e3–1486.e8.
26. Gilley, D; Blackburn, EH (1994). "Lack of telomere shortening during senescence in *Paramecium*". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (5): 1955–1958.
27. Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S.E.; Chiu, C.P.; Morin, G.B.; Harley, C.B.; Shay, J.W.; Lichtsteiner, S.; Wright, W.E. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells". *Science* 279 (5349): 349–352.
28. Weinstein BS, Ciszek D; Lansdorp (May 2002). "The reserve-capacity hypothesis: evolutionary origins and modern implications of the trade-off between tumor-suppression and tissue-repair". *Exp. Gerontol.* 37 (5): 615–27.
29. de Magalhães JP, Toussaint O (2004). "Telomeres and telomerase: a modern fountain of youth?". *Rejuvenation Res* 7 (2): 126–33.
30. Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, Viña J, Serrano M, Blasco MA (November 2008). "Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice". *Cell* 135 (4): 609–22.
31. Jaskelioff, M; Muller, FL; Paik, JH; Thomas, E; Jiang, S; Adams, AC; Sahin, E; Kost-Alimova, M; Protopopov, A; Cadiñanos, J; Horner, JW; Maratos-Flier, E; Depinho, RA (November 2010). "Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice". *Nature* 469 (7328): 102–6
32. Bernardes de Jesus, B; Vera, E; Schneeberger, K; Tejera, AM; Ayuso, E; Bosch, F; Blasco, MA (August 2012). "Telomerase gene therapy in adult and old mice delays

- aging and increases longevity without increasing cancer". *EMBO Molecular Medicine* 4 (8): 691–704.
33. Fauce SR, Jamieson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, Ng HL, Kitchen CM, Yang OO, Harley CB, Effros RB (November 2008). "Telomerase-Based Pharmacologic Enhancement of Antiviral Function of Human CD8+ T Lymphocytes". *J. Immunol.* 181 (10): 7400–6.
 34. Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB, Wright WE, Shay JW, Barzilai N, Govindaraju DR, Suh Y (January 2010). "Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 Suppl 1 (suppl_1): 1710–7.
 35. Blasco, MA (August 2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond". *Nature Reviews Genetics* 6 (8): 611–22.
 36. Skloot, Rebecca (2010). *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. New York: Broadway Paperbacks. pp. 216, 217.
 37. Shay, JW; Bacchetti, S (April 1997). "A survey of telomerase activity in human cancer". *Eur. J. Cancer* 33 (5): 787–91.
 38. Bryan, TM; Englezou, A; Gupta, J; Bacchetti, S; Reddel, RR (September 1995). "Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity". *EMBO J.* 14 (17): 4240–8.
 39. Henson, JD; Neumann, AA; Yeager, TR; Reddel, RR (January 2002). "Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells". *Oncogene* 21 (4): 598–610.
 40. Blackburn, EH (February 2005). "Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions". *FEBS Lett.* 579 (4): 859–62.
 41. Tian, X; Chen, B; Liu, X (March 2013). "Telomere and Telomerase as Targets for Cancer Therapy". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160 (5): 906–21.
 42. Raynaud, CM; Sabatier, L; Philipot, O; Olausson, KA; Soria, JC (2008). "Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process". *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 99–117.
 43. Blasco, MA; Lee, HW; Hande, MP; Samper, E; Lansdorp, PM; et al. (1997). "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA". *Cell* 91 (1): 25–34.
 44. Artandi, SE; Chang, S; Lee, SL; Alson, S; Gottlieb, GJ; et al. (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice". *Nature* 406: 641–645.
 45. Willeit Peter, Willeit Johann, Mayr Anita, Weger Siegfried, Oberhollenzer Friedrich, Brandstätter Anita, Kronenberg Florian, Kiechl Stefan; Willeit; Mayr; Weger; Oberhollenzer; Brandstätter; Kronenberg; Kiechl (2010). "Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality". *JAMA* 304 (1): 69–75.
 46. Ma, H; Zhou, Z; Wei, S; et al. (2011). "Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis". *PLOS ONE* 6 (6): e20466.
 47. Wentzensen, IM; Mirabello, L; Pfeiffer, RM; Savage, SA (2011). "The association of telomere length and cancer: a meta-analysis". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20 (6): 1238–1250.

48. Paul, L (Oct 2011). "Diet, nutrition and telomere length". *J Nurt Biochem* 22 (10): 895–901.
49. Epel, ES; Lin, J; Wilhelm, FH; Wolkowitz, OM; Cawthon, R; Adler, NE; Dolbier, C; Mendes, WB; Blackburn, EH (April 2006). "Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors". *Psychoneuroendocrinology* 31 (3): 277–87.
50. Ornish, D; Lin, J; Chan, JM; Epel, E; Kemp, C; Weidner, G; Marlin, R; Frenda, SJ; Magbanua, MJ; Daubenmier, J; Estay, I; Hills, NK; Chainani-Wu, N; Carroll, PR; Blackburn, EH (Oct 2013). "Effect of comprehensive lifestyle changes on telomerase activity and telomere length in men with biopsy-proven low-risk prostate cancer: 5-year follow-up of a descriptive pilot study". *Lancet Oncol* 14 (11): 1112–20.
51. Ornish, D; Lin, J; Daubenmier, J; Weidner, G; Epel, E; Kemp, C; Magbanua, MJ; Marlin, R; Yglecias, L; Carroll, PR; Blackburn, EH (Nov 2008). "Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study". *Lancet Oncol* 9 (11): 1048–57.
52. Aschacher; Wolf; Enzmann; Kienzl (2015). "ALINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines". *Oncogene*.
53. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR; Neumann; Yeager; Reddel (2002). "Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells". *Oncogene* 21 (4): 598–610.
54. Chris Molenaar, Karien Wiesmeijer, Nico P. Verwoerd, Shadi Khazen, Roland Eils, Hans J. Tanke, and Roeland W. Dirks (2003-12-15). "Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes". *The EMBO Journal (The European Molecular Biology Organization)* 22 (24): 6631–6641.
55. Shay, Jerry W.; Ying, Zou; Hiyama, Eiso; Wright, Woodring E. (2001). "Telomerase and Cancer". *Human Molecular Genetics* 10 (7): 677–685.
56. Gul, Ilhami; Dundar, Ozgur; Bodur, Serkan; Tunca, Yusuf; Tutuncu, Levent (2013). "The Status of Telomerase Enzyme Activity in Benign and Malignant Gynecologic Pathologies". *Balkan Medical Journal* 30: 287–292.
57. Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, Lehr CM.; Loretz; Schaefer; Lehr (April 2010). "Telomerase as an emerging target to fight cancer - Opportunities and challenges for nanomedicine". *Journal of Controlled Releases* 146 (2): 228–40.
58. Chin L, Artandi SE, Shen Q; et al. (May 1999). "p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis". *Cell* 97 (4): 527–38.
59. Greenberg RA, Chin L, Femino A; et al. (May 1999). "Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse". *Cell* 97 (4): 515–25.
60. Griffiths, Anthony J. F.; Wesslet, Susan R.; Carroll, Sean B.; Doebley, John (2008). *Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman.
61. Williams, SC (January 2013). "No end in sight for telomerase-targeted cancer drugs.". *Nat Med.* 19 (1): 6.
62. Blasco, MA (2001). "Telomeres in Cancer Therapy". *J Biomed Biotechnol.* 1 (1): 3–4.
63. Saretzki, Gabriele (2003). "Telomerase inhibition as Cancer Therapy". *Cancer Letter* 194 (2): 209–219.
64. Stoyanov, V (2009). "T-loop deletion factor showing speeding aging of Homo telomere diversity and evolution". *Rejuvenation Research* 12 (1): 52.

65. Shay, Jerry W.; Ying, Zou; Hiyama, Eiso; Wright, Woodring E. (2001). "Telomerase and Cancer". *Human Molecular Genetics* 10 (7): 677–685.
66. "Geron's cancer drug shakes off one FDA hold but remains on pause" em <http://www.fiercebiotech.com/story/gerons-cancer-drug-shakes-one-fda-hold-remains-pause/2014-06-12> (*FierceBiotech*)
67. "J&J bets up to \$935M that Geron's drug can shake a checkered past" em <http://www.fiercebiotech.com/story/jj-bets-935m-gerons-drug-can-shake-checkered-past/2014-11-13> (*FierceBiotech*)
68. Johnson, Steven Ross (September 2, 2015). "Experimental blood disorder therapy shows promise in new studies". *Modern Healthcare*.
69. Patel, Kunal P.; Robert H., Vonderheide (2004). "Telomerase as a tumor-associated antigen for cancer immunotherapy". *Cytotechnology* 45 (1-2): 91–99.
70. Tian, X; Chen, B; Liu, X (March 2013). "Telomere and Telomerase as Targets for Cancer Therapy". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160 (5): 906–21.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo por me ter orientado neste trabalho final do sexto ano do Mestrado Integrado de Medicina e pela oportunidade concedida de investigar na área de Geriatria.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional.