

Ana Maria Pereira da Silva da Costa Ferreira

Fisiopatologia dos telómeros

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019



Ana Maria Pereira da Silva da Costa Ferreira

Fisiopatologia dos telómeros

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

# Fisiopatologia dos telómeros

---

Ana Maria Pereira da Silva da Costa Ferreira

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

Orientadora:  
Professora Doutora Maria Gil Ribeiro

## **Sumário**

O telómero é uma estrutura desoxiribonucleoproteica que está presente nas extremidades dos cromossomas eucarióticos e que é constituída por repetições hexaméricas em série, especificamente 5'-TTAGGG-3', e por um complexo proteico designado por “shelterin”. Este complexo consiste num conjunto de seis proteínas evolutivamente conservadas que atuam na manutenção da integridade do DNA telomérico. A telomerase humana é um complexo ribonucleoproteico. Este complexo compreende um domínio altamente conservado com atividade de transcriptase reversa, um componente de RNA não codificante com uma região que é usada como molde, pelo local catalítico do domínio enzimático, para a síntese de DNA telomérico, e várias proteínas que participam na biogénese, montagem e recrutamento da telomerase para os telómeros. A erosão do DNA telomérico é um processo progressivo que resulta da incapacidade da DNA polimerase para replicar as extremidades lineares dos cromossomas eucarióticos. Esta limitação pode, no entanto, ser compensada pela ação da telomerase. O complexo telómero/telomerase é, assim, essencial para a estabilização e manutenção dos cromossomas, do genoma e da função celular. Alterações nos componentes deste complexo podem resultar no encurtamento ou alongamento do DNA telomérico e conduzir, subsequentemente, ao desenvolvimento de patologias específicas. Assim, este trabalho analisa os aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase, a sua relação com o envelhecimento e, ainda, as potencialidades e limitações da utilização do comprimento do DNA telomérico como biomarcador de doenças relacionadas com o envelhecimento.

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

**Abstract**

Telomere is a deoxyribonucleoprotein structure that is present at the ends of eukaryotic chromosomes. It consists of serial hexamer repeats, specifically 5'-TTAGGG-3', and a protein complex called "shelterin". This complex consists of a set of six evolutionarily conserved proteins that maintain the integrity of telomeric DNA. Human telomerase is a ribonucleoprotein complex. It comprises a highly conserved domain with reverse transcriptase activity, a noncoding RNA component with a region used as a template by the catalytic site of the enzyme domain for telomeric DNA synthesis, and various proteins with a role in the biogenesis, assembly and recruitment of telomerase to telomeres. Telomeric erosion is a progressive process that results from the inability of DNA polymerase to replicate the linear ends of eukaryotic chromosomes. This limitation may, however, be overcome by the action of telomerase. The telomere / telomerase complex is thus essential for the stabilization and maintenance of chromosomes, genomes and cellular function. Changes in the components of this complex may result in shortening or lengthening of telomeric DNA and subsequently lead to the development of specific diseases. Thus, this work reviews the structural and functional aspects of the telomere / telomerase complex, its relationship with aging, and the potentialities and limitations of using telomeric DNA length as a biomarker of aging-related diseases.

**Key words:** Aging, Cancer, Telomerase, Telomere, Telomeric DNA length.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de começar por agradecer à Universidade Fernando Pessoa por todo o apoio que me foi prestado ao longo destes cinco anos e a todos os meus professores pelos conhecimentos transmitidos que tanto contribuíram para o meu bom sucesso académico.

Em específico à Professora Doutora Maria Gil Ribeiro, pela disponibilidade, dedicação e valiosas contribuições ao longo da realização deste trabalho. As palavras motivadoras, o carinho e forma como sempre me motivou foram sem dúvida gestos que guardarei para sempre comigo. Toda a simpatia, paciência, conselhos e orientações foram imprescindíveis e de muito interesse para o meu bom desempenho e para o meu crescimento a nível profissional e pessoal.

Ao professor José Cabeda também agradeço todo o apoio que sempre me prestou e por todos os conselhos e palavras que teve comigo. Muito obrigada pela confiança e disponibilidade.

Aos meus amigos, agradeço a amizade demonstrada em todos os momentos que vivemos juntos, em especial à Carla, Filipa e Mafalda.

Ao meu namorado, agradeço o amor, a paciência e a força em todos os momentos.

Aos meus pais, agradeço todo o amor, carinho e dedicação que me presentearam em qualquer momento, ao longo destes cinco anos. Foram apoios imprescindíveis que sempre acreditaram em mim e que tornaram tudo mais fácil. Serão para sempre o meu porto seguro.

Finalmente, agradeço a toda a minha família em geral, irmão, avós, tios e primos pela contribuição que deram ao longo do meu percurso académico.

Obrigada a todos.

## **Índice**

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Índice de Figuras .....	v
Lista de abreviaturas .....	vi
I. Introdução.....	1
II. Desenvolvimento.....	3
1. DNA: aspetos básicos de estrutura e função.....	3
1.1. Cromatina e cromossomas.....	3
1.2 Replicação .....	4
1.3. Transcrição .....	6
2. Biologia dos telómeros .....	7
2.1. Estrutura e função do DNA telomérico .....	7
2.2. Estrutura, função e expressão da telomerase .....	11
2.2.1. Alongamento alternativo dos telómeros.....	16
2.3. Telomeropatias .....	17
2.4. Cancro.....	19
2.5. A telomerase como alvo terapêutico .....	20
3. Comprimento do DNA telomérico .....	23
3.1. Metodologias .....	23
3.2. Fatores de variabilidade.....	26
3.3. Potenciais aplicações como biomarcador .....	27
III. Conclusão .....	29
VI. Bibliografia.....	32

**Índice de Figuras**

Figura 1 - Estrutura do complexo DNA telomérico -“shelterin”..... 9

Figura 2 - Montagem da telomerase e recrutamento da enzima para o telómero..... 12

**Lista de abreviaturas**

**ALT** - Alongamento alternativo dos telómeros, *Alternative lengthening of telomeres*

**CTE** – Extensão C-terminal de hTERT, *C-terminal extension of hTERT*

**DC** – Disqueratose congénita, *Dyskeratosis congenita*

**DDR** - Resposta a lesões na molécula de DNA, *DNA damage response*

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico, *Desoxyribonucleic acid*

**GAR1** – Proteína 1 rica em glicerina-arginina; *Glycine/arginine-rich protein 1*

**hTERC** - RNA da telomerase humana, *Human telomerase RNA*

**hTERT** – RT da telomerase humana, *Human telomerase RT*

**mRNA** - RNA mensageiro, *Messenger RNA*

**NHP2** – Proteína 2 não histónica; *Nonhistone protein 2*

**NOP10** – Proteína 10 nucleolar; *Nucleolar protein 10*

**POT1** - Proteína 1 de proteção dos telómeros, *Protection of telomeres protein 1*

**Q-FISH** - Método quantitativo de hibridização “in situ” por fluorescência, *Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization*

**qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa, *Quantitative polymerase chain reaction*

**RAP1** - Proteína 1 ativador/repressor, *Repressor/activator protein 1*

**RNA** - Ácido ribonucleico, *Ribonucleic acid*

**rRNA** - RNA ribossomal, *Ribosomal RNA*

**RT** – Transcriptase reversa de hTERT, *Reverse transcriptase of hTERT*

**STELA** - Análise do comprimento único de telómeros, *Single Length Telomere Analysis*

**TCAB1** – Proteína 1 da telomerase e do Corpo de Cajal; *Telomerase and Cajal body protein 1*

**TEN** – Extensão N-terminal de hTERT, *N-terminal extension of hTERT*

**TERRA** - RNA com repetições teloméricas, *Telomeric repeat-containing RNA*.

**TeSLA**- Ensaio de menor comprimento dos telómeros, *Telomere Shortest Length Assay*

**TIN2** - Proteína 2 de interação com TRF1, *TRF1-interacting protein 2*

**TPP1** - Proteína de interação com TIN-2 e POT-1, *TIN2- and POT1-interacting protein*

**TRBD** – Domínio de ligação de hTERT a hTERC, *hTERT to hTERC binding domain*

**TRF** - Fragmento de restrição terminal, *Terminal Restriction Fragment*

**TRF1** - Fator 1 de ligação às repetições teloméricas, *Telomeric repeat binding factor 1*

**TRF2** - Fator 2 de ligação às repetições teloméricas, *Telomeric repeat binding factor 2*

**tRNA** – RNA de transferência, *Transfer RNA*

## **I. Introdução**

O genoma celular é representado pela totalidade da informação genética contida na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula. Vários investigadores, incluindo James Watson e Francis Crick, contribuíram para a construção do modelo da dupla hélice do DNA. Esta molécula fornece as características necessárias para o desenvolvimento e evolução do organismo através da sua capacidade para armazenar, codificar e transmitir a informação genética às gerações futuras através da replicação. Contudo, fatores diversos podem comprometer o processo de replicação, nomeadamente a integridade das extremidades dos cromossomas que são conhecidas por telómeros (Giassa *et al.*, 2018; Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014; McCulloch e Kunkel, 2008; Vivante *et al.*, 2017).

O DNA telomérico, conjuntamente com várias proteínas que interagem dinamicamente entre si e com o DNA, protege as extremidades dos cromossomas contra situações de erosão que podem ser desencadeadas por diversos fatores. No entanto, limitações inerentes à replicação das extremidades de moléculas lineares de DNA originam o seu encurtamento progressivo em sucessivas divisões celulares (Hayashi, 2017; Martínez e Blasco, 2015). Esta limitação pode ser naturalmente superada pela ativação da telomerase ou de um mecanismo de alongamento alternativo dos telómeros. Contudo, a sua desregulação por défice ou excesso poderá desencadear patologias específicas, respetivamente as telomeropatias e o cancro (Fouquerel e Opresko, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). A biologia dos telómeros revelou-se, por isso, mais enigmática e muito mais complexa do que inicialmente previsto (Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

Sendo os telómeros um dos principais promotores da estabilidade genómica e o seu encurtamento uma das causas moleculares primárias do envelhecimento porque limita a capacidade regenerativa dos tecidos, não é de surpreender que o binómio telómero/telomerase represente um alvo molecular de estratégias terapêuticas promissoras que visem prevenir e controlar o desenvolvimento de tumores e de outras doenças relacionadas com o envelhecimento (Martínez e Blasco, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

Deste modo, o presente trabalho foi elaborado com o objetivo de compreender a relação estrutural e funcional entre telómeros e telomerase através de uma revisão narrativa da informação publicada na literatura no âmbito desta temática. A metodologia subjacente à sua elaboração consistiu numa pesquisa bibliográfica recorrendo a bases de dados

científicos como o PubMed e motores de busca como o Google Académico, utilizando as palavras-chave “human telomeres”, “human telomere length”, “human telomerase”, “human telomeres and telomerase diseases” e “human telomere length methods”, e referente ao período compreendido entre julho de 2018 e junho de 2019. A consulta bibliográfica foi reportada aos últimos 5 anos, embora inclua alguns artigos publicados em anos anteriores e que foram selecionados pela relevância histórica do seu conteúdo.

## **II. Desenvolvimento**

### **1. DNA: aspetos básicos de estrutura e função**

O bloco básico de construção da molécula de DNA é o nucleótido que se organiza em três componentes: uma pentose (desoxirribose), uma base nitrogenada (adenina, citosina, guanina ou timina) e um grupo fosfato. A associação pentose-base azotada é conhecida por nucleósido. Os desoxiribonucleótidos são unidos por uma ligação química covalente designada por ligação fosfodiéster. As duas cadeias mantêm-se unidas através de ligações de hidrogénio que são estabelecidas entre pares de bases nitrogenadas, sendo que as guaninas estabelecem uma ligação mais estável com as citosinas enquanto que as adeninas se ligam com timinas. Deste modo, a dupla hélice vai possuir as bases orientadas para o interior e dois esqueletos fosfato-açúcar no exterior; as extremidades das cadeias ficam representadas pelos grupos 5'-fosfato e 3'-hidroxilo das pentoses terminais. A molécula de DNA consiste, assim, numa dupla hélice constituída por duas longas cadeias polinucleotídicas antiparalelas que avançam em direções opostas, 5'-3' e 3'-5', e que são complementares (Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014).

#### **1.1. Cromatina e cromossomas**

No caso dos organismos eucarióticos, a quantidade de informação genética é superior à dos organismos procarióticos e o seu armazenamento no núcleo é efetuado a partir da mobilização de proteínas específicas para a formação da cromatina. A cromatina resulta da repetição de unidades básicas designadas por nucleossomas (Koyama e Kurumizaka, 2018; Lenart e Krejci, 2016). O seu grau de compactação é variável, sendo a compactação máxima observada sob a forma de unidades discretas visíveis ao microscópio óptico, os cromossomas. Ao microscópico eletrónico, a cromatina é distinguida em eucromatina e heterocromatina. A eucromatina apresenta um menor nível de compactação, sendo caracterizada como uma fibra pouco densa com ~10 nm de diâmetro e com uma aparência relativamente dispersa no nucleoplasma. É a fibra maioritariamente observada durante a interfase. No caso da heterocromatina, o enrolamento da fibra de ~10 nm origina uma fibra com um diâmetro de ~30 nm. Esta região da cromatina apresenta um grau de compactação comparável à dos cromossomas metafásicos, sendo encontrada em centrómeros, telómeros e sequências altamente repetitivas. A forma comum e permanente da heterocromatina é chamada de heterocromatina constitutiva. Sendo uma região

densamente condensada, as suas sequências de DNA são mais resistentes a possíveis danos e a transcrição é inexistente ou muito reduzida. De facto, a densidade de genes nesta região é muito reduzida quando comparada com a eucromatina e os genes que são deslocados para esta região ou localizados na sua proximidade encontram-se frequentemente inativados (Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014; Lenart e Krejci, 2016).

A especificidade do emparelhamento das bases e o facto dessa interação ser assegurada por ligações não covalentes possibilita, sob condições específicas, a separação das cadeias complementares sem interferir com a sequência dos desoxiribonucleótidos. Esta característica permite que o DNA seja reproduzido com fidelidade ou, ainda, copiado para linguagem de ácido ribonucleico (RNA). Deste modo, a importância biológica do DNA reside na sua capacidade de: (i) armazenamento da informação genética, representando o genoma da célula/organismo; (ii) replicação, possibilitando a renovação celular e a transmissão da informação genética à descendência, assegurando a continuidade da espécie; e (iii) transcrição, assegurando a produção das moléculas de RNA indispensáveis para a biossíntese de proteínas. Estes processos celulares, replicação e transcrição, são sumariamente desenvolvidos nas secções seguintes do presente trabalho.

## **1.2 Replicação**

Em eucariotas, o ciclo celular compreende uma sucessão de fases que incluem o crescimento da célula, a replicação do DNA e por último a divisão celular em duas células filhas que têm a opção de reiniciarem um novo ciclo ou entrarem na fase G<sub>0</sub>. A permanência na fase G<sub>0</sub>, observada na maioria das células eucarióticas, ou a divisão contínua, tal como observado em células estaminais, depende de fatores intrínsecos, tais como o grau de instabilidade genómica, e fatores extrínsecos, incluindo hormonas de crescimento. A replicação do DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular e é do tipo semi-conservativo uma vez que cada uma das cadeias parentais atua como molde para a síntese da nova cadeia, originando dois novos dúplexes, cada um dos quais com uma cadeia parental original e uma cadeia nova. Deste modo, a cadeia parental é a unidade conservada que permite a transmissão da informação entre gerações sucessivas (Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014).

A unidade do DNA sujeita a replicação é chamada de replicão. Cada replicão possui elementos de controlo, elementos de iniciação e elementos de finalização que interatuam

com múltiplos complexos enzimáticos conduzindo o processo de replicação através das suas diferentes fases. A manutenção do DNA na forma relaxada, com o desenrolamento de eventuais segmentos superenrolados, é assegurada pela presença da enzima topoisomerase. A replicação inicia-se com a separação das duas cadeias polinucleotídicas do dúplice da molécula de DNA parental, por ação da enzima helicase, designando-se esse espaço de “forquilha de replicação”, uma espécie de bolha, que se vai “mover” sequencialmente ao longo do DNA parental, desde o seu ponto de iniciação (origem da replicação) até ao fim da replicação. A fase seguinte, a alongação, corresponde à síntese das novas cadeias de DNA através da adição de desoxiribonucleótidos pela enzima DNA polimerase. Esta fase ocorre após a ligação de um *primer* de RNA (ou RNA iniciador) sintetizado pela primase (RNA polimerase) (Ganai e Johansson, 2016; Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014). De facto, uma das características de todas as DNA polimerases é a sua impossibilidade de iniciar a síntese de novas cadeias de DNA na ausência de um *primer*. Esse *primer* consiste numa sequência de RNA que é sintetizada a partir da extremidade 5' das novas cadeias a sintetizar expondo a extremidade 3'-hidroxilo livre para reconhecimento e alongação pela DNA polimerase. Nos eucariotas existem várias DNA polimerases com funções e especificidades diferentes. Esta informação não será desenvolvida no âmbito do presente trabalho mas poderá ser consultada, por exemplo, nas publicações de Bębenek e Ziuzia-Graczyk (2018) e Ganai e Johansson (2016).

Como a DNA polimerase apenas catalisa a adição de nucleótidos complementares à sequência da cadeia modelo no sentido 5'-3' e as duas fitas do dúplice apresentam orientação antiparalela, a síntese das duas novas fitas ocorre semi-descontinuamente e em duas direções distintas, ou seja, uma das cadeias é sintetizada de forma contínua de 5'-3', na mesma direção do desenrolamento da forquilha (cadeia “leading”) e outra cadeia de forma descontínua na direção oposta ao avanço da forquilha de replicação (cadeia “lagging”). Na cadeia “leading” é necessário apenas um evento de iniciação, ou seja, um *primer*. Já na cadeia “lagging” ocorrem vários eventos de iniciação com formação de pequenos fragmentos de Okazaki. Por esse motivo, na fase final ocorre a remoção dos RNAs iniciadores e a formação da ligação covalente entre fragmentos de Okazaki sucessivos, sob ação da DNA ligase, originando a formação de uma cadeia intacta. No caso de um replicação linear, como é o caso do DNA telomérico, a replicação dos seus terminais representa um problema. A cada ciclo celular, a inexistência de um segmento na cadeia molde para ligação do RNA iniciador inviabiliza o alongamento da cadeia pela

DNA polimerase que, se não for compensada pela atividade enzimática da telomerase, origina a erosão progressiva da extremidade do DNA cromossómico (Marcomini e Gasser, 2015; Martínez e Blasco, 2015). Este aspeto será aprofundado na secção seguinte do presente trabalho.

A fidelidade e a precisão do processo de replicação dependem não só da eficiente seleção dos nucleótidos pela DNA polimerase, mas também da sua capacidade para realizar a atividade de *proofreading* (atividade de exonuclease 3'-5'), isto é, a remoção enzimática de nucleótidos incorporados incorretamente. Na eventualidade de ocorrer falha no processo de correção, existem vários mecanismos alternativos de reparação de lesões que afetam apenas uma ou ambas as cadeias de DNA (Bębenek e Ziuzia-Graczyk, 2018; Ganai e Johansson, 2016; Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014; Kunkel e Erie, 2015; McCulloch e Kunkel, 2008).

Assim, a progressão do ciclo celular é monitorizada e regulada para garantir dois requisitos essenciais: tamanho celular mínimo e ausência de danos no DNA. Estes requisitos normalmente são controlados por guardiões do ciclo celular, as denominadas proteínas supressoras do tumor, nomeadamente as proteínas Rb e p53. Caso sejam detetados danos irreversíveis, estas proteínas encaminham a célula para morte celular programada, nomeadamente por apoptose. Se as células escaparem a estes mecanismos de verificação, correção ou eliminação de danos no DNA, e não forem eliminadas, poderão ser observadas disfunções celulares de severidade variável (Ganai e Johansson, 2016; Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014).

### **1.3. Transcrição**

A transcrição ocorre essencialmente na eucromatina que é a região do genoma onde se encontram a maioria dos genes, ~20 000 - 25 000 no genoma humano. Estruturalmente, a molécula de RNA consiste numa cadeia simples constituída por ribonucleótidos em que a pentose é a ribose e as bases azotadas são a adenina, a citosina, a guanina e o uracilo (equivalente à timina no DNA). O processo de transcrição origina a formação de vários tipos de RNAs, tal como o mRNA (RNA mensageiro), o rRNA (RNA ribossomal) e o tRNA (RNA de transferência). Estes tipos de RNAs participam no processo da síntese proteica mas apenas o mRNA contém informação codificante (Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014).

A iniciação da transcrição implica o recrutamento de um conjunto complexo de fatores de transcrição. Estas proteínas são necessárias para a abertura da dupla hélice e para o reconhecimento do local de iniciação da transcrição na cadeia molde de DNA determinando, deste modo, o segmento reconhecido por enzimas dependentes de DNA, as RNA polimerases. Estas enzimas conduzem a síntese de diferentes tipos de RNAs em locais específicos do núcleo.

A nova molécula de RNA é sintetizada a partir do local de iniciação, no sentido 5'-3', com uma sequência que é complementar à cadeia modelo da molécula de DNA (orientada na direção 3'-5', cadeia "antisense") até ao local de terminação. Após a biossíntese, a molécula codificante de RNA é estabilizada e processada através da remoção das regiões não codificantes, os intrões ("splicing"), sendo exportada para o citoplasma na sua forma madura (mRNA) para posterior ligação ao ribossoma, descodificação da informação e biossíntese da proteína (tradução), aquisição da estrutura nativa e tráfego celular da respetiva proteína (Krebs, Goldstein e Kilpatrick, 2014).

## **2. Biologia dos telómeros**

### **2.1. Estrutura e função do DNA telomérico**

Em 1938, quando a composição do material genético ainda era desconhecida, a existência de uma estrutura especial na extremidade dos cromossomas foi especulada por Hermann Muller e Barbara McClintock na sequência da observação de fusões entre extremidades quebradas de cromossomas. Nessa altura, foi sugerido que a inexistência de fusões deveria implicar a proteção das extremidades dos cromossomas (Mason e Perdignes, 2013; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Contudo, só em 1978, durante o mapeamento de sequências de DNA de um ciliado eucariótico unicelular (*Tetrahymena*), Elizabeth Blackburn observou nas extremidades dos cromossomas uma sequência de repetição específica, 5' TTAGGG 3', que apelidou de "telómero". Esta observação levou à descoberta de um padrão diferenciado e conservado em eucariotas. Em 2009, Elizabeth Blackburn, Carol Greider e Jack Szostak, receberam o prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta dos telómeros e da telomerase. Desde então, registou-se um interesse crescente pela biologia dos telómeros e pela sua relação com a saúde e a doença, nomeadamente na área do envelhecimento (Mason e Perdignes, 2013; Fouquerel e Opreško, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

Os telómeros são estruturas nucleoproteicas de DNA que, em mamíferos, possuem ~10-15 Kb de comprimento. Estas estruturas consistem em repetições hexaméricas em série, ricas em guaninas e timinas, especificamente 5'-TTAGGG, que terminam na extremidade 3' numa saliência de cadeia simples rica em guaninas, conhecida por “G-strand” (cadeia G), com comprimento variável (~30-400 nucleótidos) (Fouquerel e Opresko, 2017; Marcomini e Gasser, 2015; Martínez e Blasco, 2015; Mason e Perdignes, 2013; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

O complexo proteico associado ao DNA telomérico é designado por “shelterin”. Este complexo consiste num conjunto de seis proteínas evolutivamente conservadas que se distinguem funcionalmente pelo reconhecimento e ligação específica ao DNA telomérico (Figura 1a) (Fouquerel e Opresko, 2017; Marcomini e Gasser, 2015; Martínez e Blasco, 2015; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). As proteínas TRF1 e TRF2, respetivamente fatores 1 e 2 de ligação às repetições teloméricas, ligam-se especificamente à cadeia dupla de DNA telomérico através de uma terceira proteína, a TIN2 (proteína 2 de interação com TRF1). Esta última também recruta a proteína TPP1 (proteína de interação com TIN2 e POT1, anteriormente conhecida como TINT1, PTOP ou PIP1). A TPP1 é importante para recrutar a telomerase para os telómeros e, subsequentemente, também a proteína POT1 (proteína 1 da proteção dos telómeros) que possui dois domínios com afinidade para a sequência de DNA telomérico de cadeia simples, 5' TAGGGTTAG 3', e para uma estrutura secundária telomérica denominada D-loop. Nessa medida, o número de complexos TPP1/POT1 tem sido utilizado como medida de comprimento dos telómeros (Rousseau e Autexier, 2015). Por fim, existe a proteína RAP1 (proteína 1 ativador/repressor) que interage com o complexo através da ligação exclusiva à proteína TRF2 (Fouquerel e Opresko, 2017; Martínez e Blasco, 2015; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).



O “T-loop” estabiliza e protege as extremidades cromossômicas, nomeadamente contra a perda de proteínas do complexo “shelterin”, principalmente TRF2 e/ou POT1. Deste modo, as extremidades teloméricas ficam menos suscetíveis ao reconhecimento errado por parte da maquinaria de resposta a lesões na molécula de DNA (DDR) por ação das exonucleases e, por isso, protegidas contra a degradação prematura da sequência telomérica, senescência ou apoptose celular (Fouquerel e Opresko, 2017; Marcomini e Gasser, 2015; Martínez e Blasco, 2015; Mason e Perdígones, 2013; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Xu, 2018).

Os telómeros também são propensos a formar estruturas G-quadruplexes consecutivas na extremidade da cadeia simples, uma estrutura secundária de ordem superior formada a partir de um arranjo em quadrado de guaninas unidas através de ligações de hidrogénio. Estas estruturas impedem a ligação da telomerase ao DNA telomérico. Contudo, o seu papel ainda não foi completamente esclarecido (Fouquerel e Opresko, 2017; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Xu, 2018).

Durante algum tempo, o DNA telomérico humano foi considerado uma estrutura genómica sem significado biológico devido ao seu estado heterocromático e à sua capacidade de silenciar a transcrição de genes subteloméricos, conhecido por efeito de posição dos telómeros. Contudo, recentemente, foi descoberto que a região subtelomérica, adjacente ao telómero, possui segmentos de DNA transcricionalmente ativos que podem produzir RNA não codificante denominado TERRA (RNA com repetições teloméricas). Este RNA consiste numa sequência repetida específica, UUAGGG e liga-se ao DNA telomérico através de um híbrido RNA-DNA (Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Xu, 2018). Foi sugerido que proteínas como a TRF2 também podem associar-se a TERRA e recrutá-lo para o DNA telomérico (Xu, 2018). TERRA é capaz de formar estruturas de G-quadruplex que desempenham uma papel importante na inibição da telomerase, o que está de acordo com a observação de que o aumento do nível de TERRA reduz a atividade da telomerase *in vivo* promovendo o encurtamento dos telómeros (Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Xu, 2018). Contudo, a importância deste RNA na biologia dos telómeros ainda não está completamente estabelecida e necessita de estudos adicionais de estrutura-função (Xu, 2018).

## 2.2. Estrutura, função e expressão da telomerase

A erosão do DNA telomérico é um processo progressivo que resulta da incapacidade da DNA polimerase replicar as extremidades lineares dos cromossomas eucarióticos. Esta limitação pode, no entanto, ser compensada pela ação de uma transcriptase reversa específica, a telomerase, em células com capacidade de proliferação. Esta enzima atua na manutenção das repetições teloméricas no final dos cromossomas conduzindo à estabilização cromossômica e, subsequentemente, à preservação da função celular (Dey e Chakrabarti, 2018; Jäger e Walter, 2016; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Wang e Feigon, 2017; Wu *et al.*, 2018). Os detalhes da sua estrutura e função são a seguir desenvolvidos.

A enzima telomerase humana é um complexo ribonucleoproteico que compreende um domínio com atividade de transcriptase reversa (hTERT) e um componente de RNA não codificante (hTERC ou hTR). A parte enzimática é altamente conservada e contém o local catalítico para a síntese do DNA telomérico. O hTERC contém uma região que é usada, como modelo, pela hTERT, para a síntese de DNA telomérico (Dey e Chakrabarti, 2018; Jäger e Walter, 2016; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Wang e Feigon, 2017; Webb e Zakian, 2016; Wu *et al.*, 2018). Para além de hTERT e hTERC, a telomerase humana também é constituída por proteínas “acessórias” tais como a proteína 1 da telomerase e do Corpo de Cajal (TCAB1), ribonucleoproteínas nucleolares de ligação ao hTERC, tais como a disquerina, proteína nucleolar 10 (NOP10), a proteínas 2 não histónica (NHP2), a proteína 1 rica em glicina-arginina (GAR1) e finalmente por proteínas pertencentes à família das ATPases, designadamente a pontina e a reptina (Figura 2). *In vivo*, estas proteínas desempenham um papel importante na biogénese, montagem, recrutamento da telomerase para os telómeros e na regulação da atividade da enzima (Gómez, Farina e Gómez, 2013; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Shay, 2017; Wang e Feigon, 2017; Wu *et al.*, 2018).

Apesar da extensa pesquisa sobre estas proteínas, a estrutura tridimensional da telomerase humana não só não está completamente elucidada (Leão *et al.*, 2018), como também os mecanismos através dos quais essas proteínas interagem com a telomerase permanecem pouco compreendidos (Jafri *et al.*, 2016).

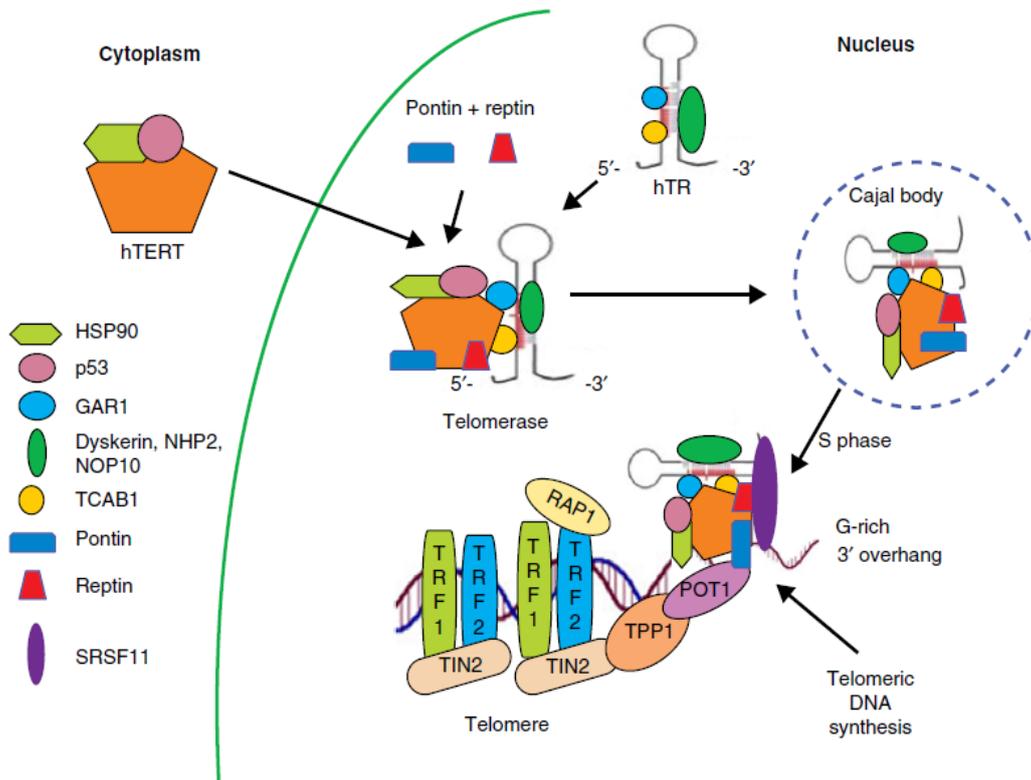


Figura 2 - Montagem da telomerase e recrutamento da enzima para o telómero. A ação da telomerase envolve várias etapas, incluindo a montagem do complexo da telomerase, seu tráfego intracelular e, finalmente, o recrutamento para os telómeros. O recrutamento da telomerase para os telómeros ocorre através de interações entre os componentes do complexo “shelterin” TPP1 e POT1 (figura adaptada de Jafri *et al.*, 2016).

A formação da telomerase é um processo que inclui várias etapas, designadamente a biossíntese dos seus componentes, a montagem, maturação e estabilização do complexo (Armstrong e Tomita, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Schmidt e Cech, 2015). No núcleo, o hTERC é transcrito por ação da RNA polimerase II e liga-se ao complexo tetramérico composto pelas proteínas disquerina, NOP10, NHP2 e GAR1 (Figura 2). A síntese da hTERT ocorre no citoplasma e, por interação com as proteínas HSP90 (proteína 90 de choque térmico) e p23, ocorrerá a translocação para o núcleo para se ligar indiretamente ao hTERC através das proteínas reptina e pontina. De seguida, através da proteína TCAB1, o complexo formado por hTERT e hTERC é encaminhado para pequenas

estruturas subcelulares denominadas de Corpos de Cajal (Figura 2) (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Dey e Chakrabarti, 2018; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Trinkle-Mulcahy e Sleeman, 2017; Webb e Zakian, 2016; Wu *et al.*, 2018). Na forma madura, hTERC é constituído por vários domínios funcionais que são essenciais para limitar a atividade da transcriptase reversa a cada ciclo de replicação. De facto, ele não só atua como molde na transcrição reversa como é essencial para assegurar a montagem, estabilidade, localização e atividade da telomerase *in vivo* (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Dey e Chakrabarti, 2018; Schmidt e Cech, 2015; Webb e Zakian, 2016).

A hTERT contém quatro domínios funcionais: o domínio N-terminal da telomerase (TEN), o domínio de ligação a hTERC (TRBD), o domínio da transcriptase reversa (RT) e o domínio de extensão C-terminal (CTE) (Dey e Chakrabarti, 2018; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Wang e Feigon, 2017; Wu *et al.*, 2018). O domínio TEN desempenha um papel fundamental no recrutamento da telomerase para os telómeros e participa na catálise da síntese repetitiva telomérica. O TRBD fornece o principal local de interação com o hTERC. Os domínios RT e CTE formam o núcleo catalítico/local ativo da enzima telomerase (Chen e Zhang, 2016; Dey e Chakrabarti, 2018; Schmidt e Cech, 2015). A sua montagem é um processo complexo e o mecanismo detalhado ainda não é claro (Chen e Zhang, 2016; Dey e Chakrabarti, 2018; Wu *et al.*, 2018).

Apesar das evidências obtidas até à data sugerirem que hTERT é importada para o núcleo para a montagem do complexo ribonucleoproteico, a possibilidade de deslocação do hTERC do núcleo para o citoplasma para ligar a hTERT não é completamente excluída (Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Zhang, Lou e Xia, 2017).

Quando a telomerase está localizada nos telómeros, o ciclo catalítico envolve duas etapas principais: a adição de nucleótidos e a repetição da adição (Chen e Zhang, 2016). Na fase S do ciclo celular, a telomerase é recrutada para os telómeros pela interação do domínio TEN da hTERT com os componentes TPP1 e POT1 do complexo “shelterin” (Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Wu *et al.*, 2018). A telomerase vai reconhecer a extremidade 3'-OH do *primer* de DNA no final da cadeia G simples e a hTERT, por transcrição reversa, vai utilizar a região modelo complementar à saliência 3' do hTERC como *primer* interno para estender a cadeia G adicionando

repetições teloméricas TTAGGG, enquanto que a cadeia complementar à cadeia G será estendida pela DNA polimerase numa fase mais tardia da fase S (Chen e Zhang, 2016; Dey e Chakrabarti, 2018; Parks e Stone, 2017; Rousseau e Autexier, 2015; Schmidt e Cech, 2015). Após a conclusão de uma repetição de DNA, a telomerase deverá dissociar-se e reposicionar-se novamente na extremidade 3' do cromossoma continuando a síntese de acordo com o modelo de adição repetida. Por último, a telomerase dissocia-se e é provavelmente desmontada durante a fase M. Trata-se de um processo complexo que compreende várias etapas e cuja dinâmica ainda não está bem estabelecida, razão pela qual têm sido descritos vários modelos para explicar o funcionamento da telomerase (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Wang e Feigon, 2017; Wu *et al.*, 2018).

Assim, uma das características típicas da telomerase é a adição repetida, isto é, um único complexo de telomerase adiciona, por cada etapa de associação ao telómero, múltiplas repetições de DNA durante o ciclo celular (Armstrong e Tomita, 2017; Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Wu *et al.*, 2018). De facto, a função da telomerase é assegurada com um nível de transcrição de hTERT reduzido sugerindo que um elevado número de cópias de transcritos hTERT poderá não ser necessário para a manutenção do comprimento do DNA telomérico (Rousseau e Autexier, 2015). *In vitro*, TPP1, juntamente com POT1, estimula e melhora a capacidade de adição repetida da telomerase, diminuindo a taxa de dissociação da telomerase do seu substrato telomérico (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Schmidt e Cech, 2015). A proteína TCAB1 compartilha este fenótipo com TPP1, mediando diretamente a interação da telomerase com o telómero (Armstrong e Tomita, 2017; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Schmidt e Cech, 2015). Esta observação sugere o envolvimento de TCAB1 no tráfego e recrutamento de telomerase para os telómeros embora, aparentemente, sem carácter obrigatório (Armstrong e Tomita, 2017; Schmidt e Cech, 2015). De salientar que em células humanas onde não são observados Corpos de Cajal (células tronco e células cancerígenas), a eficiência de montagem, tráfego e atividade de extensão telomérica da telomerase não se encontram, aparentemente, comprometidas (Chen e Zhang, 2016; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Contudo, quando a síntese da telomerase ocorre nos Corpos de Cajal, onde permanece a maior parte do ciclo celular (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016), a enzima apresenta uma maior capacidade de adição repetitiva (Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

Após a atuação da telomerase na cadeia G, a formação e ligação de um complexo denominado CST, que tem um pico em S/G2, é fundamental. Este complexo, compreendendo as proteínas CTC1, STN1 e TEN1, é estritamente dependente da telomerase e influencia a eficiência de replicação do DNA telomérico. Após atuação da telomerase, o complexo liga-se à extremidade 3' da cadeia simples de DNA telomérico por interação física com o estimulador da telomerase POT1-TPP1 e não só suprime a ação da telomerase como também facilita a interação física com a DNA polimerase para preenchimento da cadeia complementar (Parks e Stone, 2017; Schmidt e Cech, 2015; Tomita, 2018; Wang e Feigon, 2017; Wu *et al.*, 2018). A deleção deste complexo resulta na perda da cadeia complementar dos telómeros e, subsequentemente, no seu encurtamento, bem como na acumulação excessiva de saliências da cadeia G (Martínez e Blasco, 2015).

Um regulador negativo do comprimento dos telómeros é o TERRA que atua através da inibição da atividade da telomerase por interação direta com a enzima (Schmidt e Cech, 2015). Contudo, as funções detalhadas do TERRA na carcinogênese, assim como o seu significado biológico permanecem, ainda, elusivas (Chen e Zhang, 2016). A formação de certas conformações estruturais no DNA telomérico, tais como os G-quadruplexes, também poderão inibir o acesso da telomerase ao telómero. Contudo o complexo POT1-TPP1 desempenha um papel importante na prevenção da formação dessas estruturas secundárias. Por essa razão, o comprimento dos telómeros poderá ser monitorizado pela quantidade de proteínas ligadas à cadeia simples de DNA telomérico (Armstrong e Tomita, 2017), tal como já sugerido anteriormente.

Estudos de expressão da enzima em diferentes tecidos humanos mostraram que ela não é, geralmente, observada na maioria das células somáticas. Nestas células, a telomerase tem uma atividade mínima ou não detetável, e a cada ciclo de replicação ocorre o encurtamento dos telómeros até as células entrarem em senescência, uma das características principais do envelhecimento. Deste modo, o comprimento do DNA telomérico foi considerado um determinante crítico da longevidade das células normais (Marcomini e Gasser, 2015; Mason e Perdignes, 2013; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Contudo, em células que se dividem continuamente, como é o caso das células germinativas e células pluripotentes, e também em cerca de 85-90% das células cancerígenas, a atividade da telomerase é mais expressiva.

### **2.2.1. Alongamento alternativo dos telómeros**

Ao mesmo tempo que os componentes da telomerase humana foram identificados e caracterizados, Blackburn, em 1933, descobriu que as células conseguiam sobreviver sem a presença da telomerase recorrendo a um mecanismo alternativo de imortalização celular (Mason e Perdignes, 2013; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Este mecanismo, conhecido por alongamento alternativo dos telómeros (ALT), consiste num alongamento que envolve a recombinação homóloga entre telómeros de diferentes cromossomas e é responsável por cerca de 5-15% dos cancros humanos (Jäger e Walter, 2016; Mason e Perdignes, 2013; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

Evidências recentes sugerem a coexistência de ALT com a forma ativa da telomerase, o que significa que poderão interagir, em conjunto, na alongação telomérica. A escolha do mecanismo de alongação poderá ser influenciada pela localização dos telómeros. No caso da alongação do DNA telomérico ser promovida pela ação da telomerase, os telómeros deverão estar localizados nos Corpos de Cajal, enquanto que no caso do ALT os telómeros não poderão estar localizados nesse compartimento dado que deverão estar acessíveis para recombinação com outros telómeros (Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Este processo, ao contrário do processo mediado pela telomerase, ainda não está bem elucidado nomeadamente quanto ao seu mecanismo e fatores de regulação (Ivancich *et al.*, 2017; Rousseau e Autexier, 2015). Recentemente, algumas evidências sugerem que o TERRA está sob um rigoroso controlo em células com mecanismo independente da telomerase e ALT ativo representando, por isso, um potencial regulador do comprimento dos telómeros, um marcador de rastreio e/ou um alvo para tratamento de cancros com células ativas para ALT (Jäger e Walter, 2016; Rousseau e Autexier, 2015). Contudo, todos estes mecanismos precisam de ser aprofundados com vista à sua aplicabilidade em estratégias terapêuticas oncológicas (Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

### 2.3. Telomeropatias

As primeiras evidências diretas que relacionaram a deficiência na manutenção do comprimento dos telómeros humanos com certas doenças do envelhecimento, também designadas por telomeropatias, síndromes teloméricas ou distúrbios da biologia dos telómeros, foram obtidas em 1999. Estas doenças humanas hereditárias desenvolvem-se quando o desgaste dos telómeros ocorre prematuramente em consequência de mutações em genes que codificam fatores envolvidos na manutenção e reparação do DNA telomérico e/ou déficit de expressão da telomerase. Por isso, nestas doenças a capacidade proliferativa e regenerativa dos tecidos está condicionada (Bertuch, 2016; Glousker *et al.*, 2015; Hayashi, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016; Stanley e Armanios, 2015).

As telomeropatias humanas estão associadas, principalmente, à síndrome de disqueratose congênita (DC), Hoyeraal-Hreidarsson, Revesz, doença de Coats Plus, anemia aplástica, fibrose pulmonar e doença hepática (Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017; Stanley e Armanios, 2015). A idade de início e a gravidade das manifestações clínicas são variáveis mas, frequentemente, manifestam-se na infância (Bertuch, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016). Os componentes da telomerase, isto é, os produtos dos genes *TERC* e *TERT* estão envolvidos em praticamente todas estas patologias (Kong, Lee e Wang, 2013; Mondello e Chiodi, 2016).

A DC foi a primeira telomeropatia a ser descrita. Os doentes manifestam distúrbios prematuros do envelhecimento classicamente diagnosticados pela presença da tríade de sinais mucocutâneos: atrofia ungueal, pigmentação da pele e leucoplasia oral. Adicionalmente, estes doentes apresentam um risco elevado de cancro e insuficiência da medula óssea que são características clínicas comuns às síndromes dos telómeros (Ballew e Savage, 2013; Bertuch, 2016; Hayashi, 2017; Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016; Stanley e Armanios, 2015). A DC tem sido associada a mutações em vários genes relacionados com o binómio telómero/telomerase (*DKC1*, *TINF2*, *NOPI0*, *NHP2*, *TCAB1*, *CTC1*, *RTEL1*, *TERT* e *TERC*). O gene *DKC1* foi o primeiro gene associado a esta doença e codifica a proteína disquerina que desempenha funções vitais na estabilização do hTERT e na montagem da telomerase. O gene *RTEL1* codifica uma DNA helicase que atua na estabilidade, proteção e alongamento dos telómeros desmontando os “T-loops” e promovendo a sua replicação (Barrett *et al.*, 2015; Bertuch, 2016; Hayashi, 2017; Kong, Lee e Wang, 2013; Mondello e Chiodi, 2016;

Stanley e Armanios, 2015). Na síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, causada também por mutações nos genes *DKC1*, *TINF2*, *TERT*, *RTEL1* e *TPPI1*, a tríade mucocutânea associada à DC também está presente para além do atraso do crescimento intrauterino, microcefalia e morte prematura, geralmente durante as primeiras décadas de vida (Bertuch, 2016; Glousker *et al.*, 2015; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016; Stanley e Armanios, 2015). Já a síndrome Revesz está associada apenas a um gene, *TINF2*, refletindo algum aspeto único da função desse fator e é definida também pela presença de um atraso do crescimento intrauterino e microcefalia, retinopatia exsudativa bilateral e calcificação intracraniana (Bertuch, 2016). A doença de Coats Plus, associada ao gene, *CTCI*, apresenta para além das características clínicas da síndrome de Revesz adicionalmente outros sinais, designadamente telangiectasias retinianas bilaterais, anormalidades ósseas e ectasias vasculares gastrointestinais (Ballew e Savage, 2013; Mondello e Chiodi, 2016).

As patologias que tipicamente apresentam um início mais tardio são a anemia aplástica, a fibrose pulmonar e algumas doenças hepáticas (Khan, Singer e Vaughan, 2017; Kong, Lee e Wang, 2013; Mondello e Chiodi, 2016; Stanley e Armanios, 2015). A anemia aplástica é caracterizada por insuficiência de células hematopoiéticas (Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017). A fibrose pulmonar pode manifestar-se na idade adulta em indivíduos com DC, sendo uma doença progressiva e potencialmente fatal que se caracteriza por tosse, dispneia e lesões pulmonares como fibrose, inflamação intersticial e deposição de colagénio (Bertuch, 2016; Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017; Stanley e Armanios, 2015). As doenças hepáticas associadas ao encurtamento dos telómeros caracterizam-se, principalmente, por fibrose com inflamação e hiperplasia nodular regenerativa (Martínez e Blasco, 2017).

O encurtamento acelerado do DNA telomérico também tem sido implicado em numerosas doenças metabólicas e inflamatórias, como doenças cardiovasculares, aterosclerose, diabetes *mellitus*, osteoporose, obesidade, colite ulcerativa, doença de Alzheimer, lúpus eritematoso sistémico, etc. (Astuti *et al.*, 2017; Barrett *et al.*, 2015; Kong, Lee e Wang, 2013; Müezziner, Zaineddin e Brenner, 2014; Mundstock *et al.*, 2015; Quinlan *et al.*, 2014). Nestas doenças multifatoriais, fatores genéticos e ambientais promovem o desgaste dos telómeros pelo que, nestes casos, a elucidação da base genética do encurtamento do DNA telomérico requisita estudos adicionais (Kong, Lee e Wang, 2013; Zhu, Belcher e Van der Harst, 2011).

## 2.4. Cancro

A ativação da telomerase constitui um mecanismo protetor crucial das células humanas assegurando a estabilidade do genoma durante a divisão celular e prevenindo, por isso, a senescência celular. De facto, e tal como acima mencionado, o encurtamento telomérico conduz à instabilidade genómica e, eventualmente, à apoptose. Contudo, a ativação da telomerase pode originar a progressão para um estado oncogénico no qual as células adquirem a capacidade de divisão contínua readquirindo telómeros sucessivamente mais longos (Dey e Chakrabarti, 2018; Fouquerel e Opresko, 2017; Jäger e Walter, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Mason e Perdignes, 2013; Ropio *et al.*, 2016; Schmidt e Cech, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Wang e Feigon, 2017; Webb e Zakian, 2016; Wu *et al.*, 2018). Embora subsista uma relação clara entre telómeros curtos e os fenótipos de envelhecimento prematuro que sugere um potencial benefício entre telómeros longos e saúde/longevidade, há estudos que apontam uma potencial ligação entre o alongamento telomérico e o aumento de risco de cancro, apesar desta associação não ser, ainda, totalmente clara. Os resultados até agora obtidos sugerem que este mecanismo é particularmente frequente no melanoma e no glioma (Barrett *et al.*, 2015; Hayashi, 2017; Stanley e Armanios, 2015). As primeiras evidências surgiram numa família que apresentava melanoma e na qual foi identificada uma mutação ativadora no promotor do gene *TERT*. Este tipo de mutação foi encontrada em 70% dos melanomas, relevando a importância da sua sobreexpressão no desenvolvimento deste tipo de cancro (Barrett *et al.*, 2015; Hayashi, 2017; Mondello e Chiodi, 2016; Stanley e Armanios, 2015). Na maioria das células cancerígenas, a sua imortalidade replicativa deve-se, maioritariamente, a alterações no promotor do gene do componente hTERT, pela ocorrência de um mecanismo genético e/ou epigenético incluindo, respetivamente, mutações e/ou metilações, que o reativam de forma robusta conduzindo a uma sobreexpressão não desejada da telomerase. Resultados recentes também evidenciam a associação de mutações no gene *POT1* com o aparecimento do melanoma e do glioma, bem como de outros tipos de tumores, incluindo o cancro da mama, pulmão, endométrio e cérebro (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Jäger e Walter, 2016; Leão *et al.*, 2018; Lipinska *et al.*, 2017; Mason e Perdignes, 2013; Ropio *et al.*, 2016; Schmidt e Cech, 2015; Shay, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Xu e Goldkorn, 2016). Globalmente, estas observações sugerem que o alongamento dos telómeros favorece o desenvolvimento do tumor. No entanto, o seu papel na progressão

do tumor não é, ainda, totalmente conhecido (Bertuch, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016).

## **2.5. A telomerase como alvo terapêutico**

A telomerase não é expressa na maioria das células somáticas normais, sendo amplamente expressa e essencial para a imortalidade replicativa em 90% dos cânceros humanos. Por essa razão, a telomerase é considerada um potencial biomarcador de diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos de cancro e um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para estas doenças (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Leão *et al.*, 2018; Xu e Goldkorn, 2016; Zhang, Lou e Xia, 2017). Por outro lado, a sua ativação também representa uma estratégia potencial na medicina regenerativa para superar a senescência das células e tratar doenças relacionadas com a longevidade que, em muitos casos, são causadas pelo encurtamento do DNA telomérico (Dey e Chakrabarti, 2018; González-Giraldo *et al.*, 2016; Jäger e Walter, 2016; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Shay, 2017).

Nas últimas duas décadas, várias estratégias dirigidas ao tratamento do cancro foram desenvolvidas e algumas encontram-se já numa fase avançada de investigação. Estas estratégias são discutidas com base no mecanismo de inibição da telomerase: (1) estratégias baseadas em telómeros; (2) interferência com a montagem do complexo da telomerase; (3) inibição direta da telomerase; (4) terapia dirigida pelo promotor hTERT ou hTERC; e (5) vacinas de telomerase (Jafri *et al.*, 2016; Shay, 2017; Xu e Goldkorn, 2016).

As abordagens baseadas em telómeros interferem diretamente com a estrutura telomérica, mas não com a telomerase. Portanto, essas estratégias poderão ser aplicadas em neoplasias negativas para telomerase que mantêm seus telómeros usando o mecanismo ALT (Armstrong e Tomita, 2017; Ivancich *et al.*, 2017; Jäger e Walter, 2016; Webb e Zakian, 2016; Xu e Goldkorn, 2016). Alguns exemplos de abordagens baseadas em telómeros são: a) estabilizadores G-quadruplex, tornando a extremidade telomérica inacessível à telomerase ou a ALT, acelerando o encurtamento dos telómeros e a subsequente morte celular (Chen e Zhang, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Jäger e Walter, 2016; Lipinska *et al.*, 2017; Mason e Perdignes, 2013; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Xu e Goldkorn, 2016); b) oligonucleotídeos teloméricos (T-oligo) que

são homólogos à saliência telomérica dos telómeros e competem com o DNA telomérico na ligação ao complexo “shelterin”, expondo a sequência telomérica a DDR. Contudo o seu mecanismo de ação ainda está sob investigação e o facto de serem suscetíveis a degradação *in vivo* faz com que sejam necessários mais estudos, razão pela qual ainda não se encontram na fase de investigação de ensaio clínico (Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Xu e Goldkorn, 2016); c) inibidores da proteína tankyrase 1 (TNKS1), uma poli-ADP-ribosiltransferase que interfere com o alongamento do DNA telomérico através da inibição da dissociação do TRF1 dos telómeros, tornando-os menos acessíveis à telomerase. Neste âmbito, vários inibidores estão a ser testados, mas a investigação ainda não se encontra na fase de ensaio clínico (Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Xu e Goldkorn, 2016) .

No caso da estratégia que visa a interferência com a montagem do complexo da telomerase, os estudos realizados mostraram que a indução de mutações específicas no modelo do hTERC causa uma reprogramação da telomerase para adicionar repetições teloméricas mutantes que induzem a DDR uma vez que as proteínas do complexo telomérico deixam de reconhecer a extremidade mutada. Esta desafiante abordagem terapêutica permanece sob investigação (Xu e Goldkorn, 2016).

Relativamente à inibição direta da telomerase, esta é talvez a estratégia terapêutica mais intuitiva e diz respeito ao desenvolvimento do oligonucleotídeo Imetelstat (GRN163L). Este foi o primeiro oligonucleotídeo modificado a ser desenvolvido e que prosseguiu para a fase de ensaio clínico como um agente anticâncer, tendo sido demonstrada a sua potente ação inibitória contra a telomerase (Chen e Zhang, 2016; Jafri *et al.*, 2016; Jäger e Walter, 2016; Rousseau e Autexier, 2015). O Imetelstat atua por acoplamento antagonista com o componente modelo do hTERC que apresenta elevada afinidade e elevada especificidade para o local ativo da holoenzima telomerase conduzindo, assim, à inibição total da atividade enzimática da enzima e originando encurtamento telomérico, eventual DDR e morte celular (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Jäger e Walter, 2016; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017; Rousseau e Autexier, 2015; Xu e Goldkorn, 2016).

A terapia dirigida inclui: (1) vírus oncolíticos que se replicam especificamente em células tumorais que apresentam os promotor hTERT e hTERC ativos causando a sua lise e poupando as células benignas com esses promotores inativos (Jäger e Walter, 2016; Xu e

Goldkorn, 2016); (2) fitoquímicos, substâncias presentes naturalmente em frutos, leguminosas e outros vegetais que apresentam atividade biológica, designadamente compostos fenólicos ou carotenóides (Baena, 2015). O seu modo de ação é apenas parcialmente conhecido e inclui, por exemplo, a inibição da translocação da hTERT para o núcleo e subsequente diminuição da atividade da telomerase (Chen e Zhang, 2016; Jäger e Walter, 2016).

A imunoterapia anti-telomerase explora a expressão relativamente elevada da telomerase em células tumorais e tem por objetivo sensibilizar o sistema imunológico para células tumorais que expressam à sua superfície peptídeos hTERT. Neste caso, a produção de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> e linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, específicos para esses peptídeos produzem os efeitos antitumorais (Jafri *et al.*, 2016; Xu e Goldkorn, 2016). A imunoterapia baseada na telomerase inclui várias abordagens e algumas delas já estão a ser testadas em casos clínicos (Jafri *et al.*, 2016; Xu e Goldkorn, 2016). Um exemplo é o desenvolvimento de vacinas como a GV1001, Vx001 e GRNVAC1 que são baseadas em peptídeos hTERT. A sua aplicação originou o desenvolvimento de respostas imunes específicas em tumores positivos para a telomerase, tendo sido observados efeitos secundários reduzidos em células normais bem como ausência de autoimunidade. Contudo, a sua toxicidade no longo prazo ainda não foi caracterizada (Armstrong e Tomita, 2017; Chen e Zhang, 2016; Jafri *et al.*, 2016; Xu e Goldkorn, 2016).

Uma desvantagem da maioria destas estratégias que tem por alvo a telomerase é que a sua eficácia anti-tumoral depende do encurtamento dos telómeros para um comprimento crítico indutor de morte celular o que, normalmente, requer uma série de ciclos de divisão (Armstrong e Tomita, 2017; Rousseau e Autexier, 2015; Jäger e Walter, 2016; Shay, 2017; Webb e Zakian, 2016). Para além disso, a inibição da telomerase a longo prazo pode desencadear efeitos negativos em células altamente proliferativas que necessitem dessa atividade enzimática para assegurar a sua fisiologia (Jäger e Walter, 2016; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017).

### **3. Comprimento do DNA telomérico**

#### **3.1. Metodologias**

Um dos maiores desafios tem consistido no desenvolvimento de técnicas para a determinação do comprimento do DNA telomérico com vista à sua aplicação no estudo da relação entre o comprimento dos telómeros e a patobiologia dessas doenças (Montpetit *et al.*, 2015; Lai, Wright e Shay, 2018). Nesse sentido, o sangue periférico é um tecido adequado para a realização de estudos epidemiológicos e os leucócitos são células nucleadas que possibilitam amostras de DNA com um grau de qualidade adequado (Barrett *et al.*, 2015; Behrens *et al.*, 2017; Martens e Nawrot, 2016).

Ao longo dos anos, vários métodos foram desenvolvidos como é o exemplo da análise do fragmento de restrição terminal (TRF), o método quantitativo de hibridização “in situ” por fluorescência (Q-FISH) ou por citometria de fluxo (*Flow-FISH*), a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR, PCR quantitativo) e qPCR multiplex monocromático (MMQ-PCR), ou a análise de comprimento único de telómeros (STELA) e também o ensaio de menor comprimento dos telómeros (TeSLA) (Behrens *et al.*, 2017; Lai, Wright e Shay, 2018).

Após o isolamento e caracterização da sequência telomérica no final da década de 80, o primeiro e único método de determinação do comprimento do DNA telomérico e que ainda é atualmente utilizado foi a análise TRF por “Southern blot”. Esta análise é altamente reprodutível e é considerada a análise “padrão” pois tem sido usada como referência dos métodos desenvolvidos a partir de então (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Montpetit *et al.*, 2015). Neste procedimento, o DNA é inicialmente digerido com um conjunto de enzimas de restrição que não reconhecem as sequências das regiões telomérica e subtelomérica (portanto, não “cortam” o DNA telomérico); após a transferência dos fragmentos de restrição para uma membrana de nylon, é efetuada a hibridização com uma sonda específica para o DNA telomérico, lavagem e exposição para visualização dos telómeros e estimativa do seu comprimento médio (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Behrens *et al.*, 2017; Lai, Wright e Shay, 2018; Montpetit *et al.*, 2015). A exigência de grande quantidade de DNA inicial e o tempo de realização relativamente longo, bem como a impossibilidade de detetar e quantificar telómeros que são relativamente curtos (2 kb ou menos), limitam a sua utilização em estudos epidemiológicos e populacionais. Para além disso, a inexistência de padronização em

relação às enzimas de restrição tem originado variações até 5% na estimativa do comprimento dos telómeros devido, nomeadamente, à inclusão de segmentos de DNA subtelomérico contíguos ao telómero. Este facto conduz à sobrestimação do comprimento verdadeiro dos telómeros e dificulta a comparação de resultados entre diferentes estudos (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Behrens *et al.*, 2017; Lai, Wright e Shay, 2018).

No método Q-FISH, o comprimento médio do DNA telomérico é quantificado por microscopia de fluorescência digital através da análise da intensidade da fluorescência após a hibridização dos telómeros com uma sonda telomérica sintética marcada um fluorocromo desenvolvida em 1991 (oligómero PNA - *peptide nucleic acid*). Neste caso, o sinal fluorescente detetado é quantificado por análise comparativa com padrões representados por DNA telomérico de comprimento conhecido utilizando um software específico de análise de imagem. Esta técnica permite identificar os terminais cromossómicos com telómeros mais longos (sinais mais fortes) ou mais curtos (sinais mais fracos) (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Lai, Wright e Shay, 2018; Montpetit *et al.*, 2015). O Q-FISH apresenta a vantagem de fornecer informação muito precisa sobre telómeros com comprimentos mais curtos, tendo sido otimizado e considerado especialmente vantajoso no estudo do comprimento de telómeros em células raras. Contudo, este procedimento não é adequado para estudos epidemiológicos em larga escala visto ser uma técnica trabalhosa, dispendiosa, que exige quantidades significativas de amostra e células mitoticamente ativas, bem como tecnicamente exigente pois requer o uso de instrumentos específicos e citogenistas altamente qualificados com experiência e conhecimento ao nível do processamento e da análise dos dados (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Lai, Wright e Shay, 2018; Montpetit *et al.*, 2015; Shay, 2017). Para contornar estas limitações, foram desenvolvidas opções Q-FISH de maior rendimento como o Fluxo-FISH que permite medir e comparar o comprimento do DNA telomérico de múltiplas células através da análise da fluorescência dos telómeros por citometria de fluxo. É um método muito preciso, rápido e sensível, e representa o primeiro método validado para fins de diagnóstico clínico pois mede com precisão o comprimento do DNA telomérico, mesmo em populações de células distintas dentro de uma única amostra. Não obstante, não deixa de ser uma técnica trabalhosa, dispendiosa e ainda inadequada para estudos em larga escala pois requer grandes quantidade de sangue fresco (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Behrens *et al.*, 2017; Montpetit *et al.*, 2015; Lai, Wright e Shay, 2018).

Dos vários métodos utilizados para determinar o comprimento do DNA telomérico, a análise de TRF e a qPCR têm sido os dois métodos mais utilizados em estudos epidemiológicos. Esta última técnica foi descrita pela primeira vez por Richard Cawthon, em 2002, e baseia-se na amplificação e comparação da razão de T (telómeros) / S (gene de cópia única) obtida entre o DNA de uma amostra e o DNA de referência. A proporção T/S, equivalente ao comprimento médio dos telómeros existentes numa célula, não permite, contudo, quantificar o comprimento do telómero de cada cromossoma. O método qPCR tem sido muito utilizado até o momento em vários estudos populacionais, clínicos e epidemiológicos de larga escala visto ser um procedimento relativamente fácil, de realização rápida, relativamente económico pois necessita de quantidades relativamente reduzidas de DNA e com possibilidade de adaptação a um formato de alto rendimento e produtividade (Behrens *et al.*, 2017; Cawthon, 2002; Lai *et al.*, 2017; Lai, Wright e Shay, 2018; Lin *et al.*, 2019; Montpetit *et al.*, 2015; Muezzinler, Zaineddin e Brenner, 2014). Em 2009, Cawthon adaptou o protocolo original para tentar otimizar a eficiência da metodologia resultando na sua versão aprimorada MMQ-PCR. Com a amplificação conjunta das regiões de DNA telomérico e do gene de cópia única, no mesmo ensaio é reduzida a variabilidade entre ensaios, tendo sido observado um aumento da reprodutibilidade dos resultados e diminuição do custo dos reagentes (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Cawthon, 2009; Lin *et al.*, 2019; Montpetit *et al.*, 2015). Outra adaptação da técnica básica baseada em qPCR foi desenvolvida por O'Callaghan e Fenech em 2011 e descrita por esses mesmos autores como um método qPCR de comprimento absoluto dos telómeros. O procedimento é realizado segundo um protocolo semelhante ao do ensaio qPCR inicial (razão T/S com base na amplificação da região telomérica e região de gene de cópia única em tubos ou poços separados) mas inclui uma curva padrão com DNA telomérico de comprimento conhecido.

Uma limitação dos ensaios baseados em TRF e PCR é que os valores resultantes desses métodos fornecem apenas medidas do comprimento médio dos telómeros e não fornecem informação sobre o comprimento específico de cada telómero. Para atender a essa necessidade, Baird *et al.*, 2003 criaram a técnica STELA que é também uma tecnologia baseada em PCR que amplifica o DNA telomérico de cada extremidade cromossómica pelo uso de *primers* específicos (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Montpetit *et al.*, 2015). Este método foi otimizado para um subconjunto de cromossomas. A maior vantagem reside na capacidade de gerar medições de comprimento de telómeros altamente precisas

com material inicial limitante tornando-se, por isso, adequado para estudos em que a concentração de células é baixa (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Lai, Wright e Shay, 2018; Montpetit *et al.*, 2015).

Face à necessidade de um método mais sensível, altamente reprodutível e preciso para a quantificação do comprimento do DNA telomérico, foi desenvolvido o método TeSLA. Apesar de caro, este método requer pequenas quantidades de DNA e emprega uma estratégia melhorada da análise clássica por “Southern blot” já que usa uma sonda hipersensível marcada com digoxigenina e um software de processamento de imagem de fácil utilização para a determinação automática da distribuição do comprimento dos telómeros de todas as extremidades cromossômicas e até um comprimento máximo de 18 kb (Lai *et al.*, 2017; Lai, Wright e Shay, 2018).

Visto não existir uma técnica ideal para a quantificação do comprimento do DNA telomérico com elevada precisão, facilidade e rapidez, a escolha da metodologia deverá ponderar as potencialidades e as limitações das várias técnicas disponíveis face ao objetivo e condições de realização do estudo (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Barrett *et al.*, 2015; Lai, Wright e Shay, 2018; Lin *et al.*, 2019; Montpetit *et al.*, 2015).

### **3.2. Fatores de variabilidade**

Para além do encurtamento natural referido anteriormente, outros fatores, designadamente ambientais e hereditários, poderão estar implicados desde a vida uterina até à idade adulta no processo de encurtamento acelerado do DNA telomérico. Por isso, a avaliação do impacto do encurtamento do DNA telomérico no estado biológico e funcional de um organismo deverá integrar e ponderar a informação de todas essas variáveis (Barrett *et al.*, 2015; Dugdale e Richardson, 2018; Müezzlinler, Zaineddin e Brenner, 2014; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011).

Dois desses fatores são, por exemplo, o género e a etnia. Embora não haja diferença aparente ao nascimento, o comprimento do DNA telomérico tem-se mostrado consistentemente mais longo em mulheres, eventualmente devido a um aumento de atividade da telomerase desencadeada pelo estrogénio (Barrett *et al.*, 2015; Martens e Nawrot, 2016; Müezzlinler, Zaineddin e Brenner, 2014; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011). Em relação à ancestralidade, existe alguma evidência preliminar de que o

comprimento telomérico em adultos poderá ser influenciado por esse fator na medida em que vários estudos sugerem que o comprimento do DNA telomérico é maior nos africanos do que nos europeus (Müezziner, Zaineddin e Brenner, 2014; Needham *et al.*, 2013; Walton *et al.*, 2016; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011).

Para além destes fatores, muitos outros como tabagismo, obesidade, consumo de álcool, exposição solar, má alimentação, nível de stresse, nível socioeconómico, maus-tratos na infância e outros eventos adversos da vida também têm sido frequentemente associados a telómeros mais curtos (Barrett *et al.*, 2015; Müezziner, Zaineddin e Brenner, 2014; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011). A exposição à poluição do ar causada pelas emissões dos veículos automóveis também parece ter impacto na taxa de erosão dos telómeros. Segundo a OMS, estima-se que a exposição a partículas provenientes de fontes antropogénicas conduza a uma perda média de 8,6 meses de esperança de vida na Europa (Martens e Nawrot, 2016). Neste sentido, vários estudos epidemiológicos têm investigado se a exposição a material particulado provenientes de emissões de tráfego automóvel e atividades industriais tem impacto no envelhecimento através da alteração do comprimento do DNA telomérico. Contudo, essa relação não está, ainda, claramente esclarecida. Resultados de várias investigações sugerem que a presença de telómeros mais curtos pode ser atribuída ao facto destes se tornarem mais prevalentes à medida que os indivíduos envelhecem. Simultaneamente, o enfraquecimento imunitário aumenta a suscetibilidade a diferentes doenças, incluindo as infeções. Deste modo, a relação entre o comprimento do DNA telomérico e a suscetibilidade a infeções, designadamente as infeções virais pela sua prevalência, deverá ser aprofundada no futuro (Bellon e Nicot, 2017; Hou *et al.*, 2013; Janicki-Deverts *et al.*, 2013; Troy e Bosco, 2016; Walton *et al.*, 2016).

### **3.3. Potenciais aplicações como biomarcador**

As células jovens e saudáveis apresentam telómeros longos e totalmente protegidos mas o processo de encurtamento telomérico que ocorre ao longo da vida faz com que estes atinjam um comprimento crítico, conhecido como “limite de Hayflick”, após um número finito de divisões, (~52 mitoses) (Barrett *et al.*, 2015; Hayflick e Moorhead, 1961; Martínez e Blasco, 2017). Este mecanismo biológico é aquele que melhor caracteriza o envelhecimento celular uma vez que permite prever o início da senescência replicativa

(Hayashi, 2017; Stanley e Armanios, 2015). No caso de não ocorrer a ativação compensatória da telomerase ou do mecanismo ALT, observa-se a paragem irreversível no ciclo celular (Barrett *et al.*, 2015; Hayashi, 2017; Khan, Singer e Vaughan, 2017; Martens e Nawrot, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016). Contudo, e apesar do envelhecimento ocorrer inevitavelmente com o tempo em todos os organismos, o processo de envelhecimento não ocorre de maneira uniforme. Indivíduos com a mesma idade cronológica têm diferentes estados de saúde, doenças e incapacidades e, por esse motivo, deverá ser avaliada a idade biológica distintamente da idade cronológica (Khan, Singer e Vaughan, 2017; Martens e Nawrot, 2016).

A observação comum e bastante consistente na literatura de que o encurtamento dos telómeros ocorre com o aumento da idade cronológica, resultou na possibilidade, considerada recentemente, do comprimento do DNA telomérico ser um biomarcador do envelhecimento e um preditor de várias doenças relacionadas com a idade, incluindo doenças cardiovasculares, oncológicas e neurodegenerativas (Barrett *et al.*, 2015; Hayashi, 2017; Khan, Singer e Vaughan, 2017; Kong, Lee e Wang, 2013; Martínez e Blasco, 2017; Mondello e Chiodi, 2016; Müezziner, Zaineddin e Brenner, 2014; Stanley e Armanios, 2015; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011).

Os biomarcadores do envelhecimento deverão apresentar as seguintes características: i) altamente correlacionáveis com a idade cronológica, ii) prever o declínio do sistema orgânico e do envelhecimento global, e iii) ser medido de maneira confiável (Khan, Singer e Vaughan, 2017). O comprimento telomérico está sujeito a um considerável erro de medição e a variabilidade ao longo do tempo. Por isso, será necessário, em primeiro lugar, entender os determinantes moleculares e fisiológicos que conduzem os processos complexos e multifatoriais subjacentes ao ritmo variável do envelhecimento biológico em humanos e, em segundo lugar, dispor de informação útil para investigar e avaliar o estado de saúde e a doença ao longo da vida, conferir uniformidade no desenho e prossecução dos estudos para que sejam obtidos resultados informativos e comparáveis. Nesse sentido, é importante que o comprimento do DNA telomérico seja determinado antes e após o diagnóstico da doença. Ultrapassadas estas limitações, no futuro é possível que o comprimento telomérico constitua um biomarcador útil de risco ou de progressão da doença (Barrett *et al.*, 2015). Contudo, dada a natureza sistémica do processo de envelhecimento, um único biomarcador não deverá ser suficiente para refletir a natureza complexa deste processo.

### **III. Conclusão**

Os conhecimentos sobre a biologia dos telómeros e da telomerase amadureceram substancialmente ao longo do tempo. O interesse e a atualidade do tema ao nível da comunidade científica refletem-se no elevado número de trabalhos que tem sido publicados nos últimos anos.

Os telómeros estão presentes em todas as extremidades de cromossomas lineares como uma característica essencial e especial, promovendo a sobrevivência e a proliferação celular, diminuindo a probabilidade do aparecimento de patologias relacionadas com o envelhecimento e a carcinogénese. Esta estrutura tem como objetivo proteger, limitar e estabilizar a extremidade 3' (cadeia G) de cadeia simples dos cromossomas lineares. Deste modo, ela não é reconhecida como uma quebra de fita dupla do DNA nem sinalizada para degradação ou reparação que, a ocorrer, originaria a erosão do DNA ou possíveis fusões dos terminais cromossómicos, respetivamente. A estabilidade do genoma depende não só da manutenção da estrutura telomérica como também da fidelidade da sua replicação. O avanço do conhecimento sobre a biologia do binómio telómero/telomerase tem revelado a participação de um número crescente de proteínas que, coletivamente, atuam no sentido de evitar o encurtamento e erosão do DNA telomérico, a cada ciclo celular, contrariando a limitação intrínseca do processo replicativo, e este equilíbrio é crucial para a manutenção da estabilidade do genoma (Fouquerel e Opresko, 2017; Gorbunova e Seluanov, 2016; Marcomini e Gasser, 2015; Martínez e Blasco, 2015; Mason e Perdignes, 2013; Mondello e Chiodi, 2016; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017). Contudo, a complexidade molecular não se resume ao complexo “shelterin-telómero”. Nas últimas décadas, a identificação de TERRA e de várias proteínas cujo papel na proteção, regulação e/ou processamento do DNA telomérico ainda está por caracterizar, têm revelado que a biologia dos telómeros é bem mais complexa do que inicialmente suposto e atualmente coloca, ainda, muitos desafios (Martínez e Blasco, 2015; Rousseau e Autexier, 2015; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017).

O papel da biologia dos telómeros no desenvolvimento de doenças relacionadas com o envelhecimento, a maioria de natureza multifatorial, é apenas parcialmente compreendido. A variabilidade interindividual ao nível do comprimento do DNA telomérico sugere que muitos outros fatores, para além da idade cronológica, podem

influenciar o processo de envelhecimento do organismo como por exemplo, fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e o estilo de vida. Se o encurtamento dos telómeros, tal como observado nesses casos, é causa e/ou efeito dessas doenças não está, ainda, claramente estabelecido (Kong, Lee e Wang, 2013; Zhu, Belcher e van der Harst, 2011).

Assim, é importante reconhecer que a determinação do comprimento do DNA telomérico apresenta, ainda, alguma complexidade. Tal como acontece com qualquer avanço tecnológico ou metodológico, um nível adequado de reprodutibilidade, confiabilidade e rigor implica processos de otimização sucessivos. Essa otimização visa a padronização de protocolos tendo em vista não só qualidade dos resultados de estudos de investigação, mas também a possibilidade da sua análise comparativa para que seja obtida uma resposta clara ao problema original. Nesse sentido, uma revisão metodológica cuidadosa de cada etapa do processo analítico poderá ser importante, incluindo a amostra biológica selecionada, a metodologia de colheita da amostra, métodos de extração de DNA, transporte, armazenamento e processamento, procedimentos de ensaio, bem como o impacto do uso de diferentes reagentes e *primers* (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Barrett *et al.*, 2015; Denham, Marques e Charchar, 2014; Lai, Wright e Shay, 2018; Lin *et al.*, 2019; Montpetit *et al.*, 2015). Adicionalmente, o comprimento do DNA telomérico deverá ser monitorizado em fases diferentes da vida para que a informação relativa aos efeitos dos múltiplos fatores sobre os telómeros possa ser integrada e avaliada. Trata-se de um requisito de grande complexidade mas que será essencial para explorar a aplicação do comprimento do DNA telomérico como biomarcador do estado de saúde (Aubert, Hills e Lansdorp, 2012; Behrens *et al.*, 2017; Montpetit *et al.*, 2015; Lai, Wright e Shay, 2018; Lin *et al.*, 2019; Turner, Vasu e Griffin, 2019).

A inter-relação entre telómeros, telomerase e saúde humana é também evidenciada através do espectro de doenças causadas pelo encurtamento precoce dos telómeros ou pela formação de células malignas (Armstrong e Tomita, 2017; González-Giraldo *et al.*, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Rousseau e Autexier, 2015).

Apesar do crescente entendimento sobre as alterações moleculares associadas às telomeropatias, as únicas intervenções terapêuticas clinicamente benéficas nestes casos são o transplante de medula óssea (Holohan, Wright e Shay, 2014; Martínez e Blasco, 2017; Stanley e Armanios, 2015) e a terapia de ativação da telomerase (Bär e Blasco, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Smith, 2018). Contudo, estas estratégias devem ser

utilizadas com precaução, considerando seus potenciais efeitos secundários e o potencial de desenvolvimento do cancro (Bär e Blasco, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Smith, 2018). No caso de cancros associados a telómeros longos, a inibição da telomerase poderá ser eficaz na sua prevenção e/ou tratamento (Stanley e Armanios, 2015). Uma compreensão mais ampla sobre a estrutura, biogénese e mecanismo de ação da telomerase será importante para fornecer novas pistas que conduzam a avanços significativos no tratamentos do cancro (Chen e Zhang, 2016; Leão *et al.*, 2018; Shay, 2017; Venkatesan, Khaw e Hande, 2017; Zhang, Lou e Xia, 2017). Neste âmbito, será importante a elucidação dos mecanismos de reativação da telomerase, principalmente os baseados em mutações no promotor de hTERT visto que este é o mecanismo de ativação mais frequentemente observado em muitos tipos de cancros. Por isso, esta poderá representar uma abordagem mais eficaz e mais promissora para alcançar a inibição da proliferação e diferenciação das células cancerígenas e, ao mesmo tempo, minimizar os efeitos citotóxicos em células normais que não contêm mutações do promotor TERT (Armstrong e Tomita, 2017; Brown *et al.*, 2014; Chen e Zhang, 2016; González-Giraldo *et al.*, 2016; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Leão *et al.*, 2018; Ozturk, Li e Tergaonkar, 2017).

Por enquanto, o desenvolvimento de um inibidor da telomerase que elimine rapidamente as células tumorais telomerase-positivas e poupe as células normais com telomerase ativa constitui, ainda, um desafio (Jafri *et al.*, 2016).

No futuro, a continuidade da investigação será essencial para aprofundar o conhecimento da biologia do complexo telómero/telomerase e para a transferência desse conhecimento para a promoção de uma vida saudável, com maior longevidade e qualidade, designadamente no âmbito da prevenção, prognóstico e tratamento de doenças associadas com o envelhecimento (Armstrong e Tomita, 2017; Ivancich *et al.*, 2017; Jafri *et al.*, 2016; Martínez e Blasco, 2017; Mason e Perdignes, 2013; Mondello e Chiodi, 2016; Müezziner, Zaineddin e Brenner, 2014; Shay e Wright, 2019).

## VI. Bibliografia

Armstrong, C. A. and Tomita, K. (2017). Fundamental mechanisms of telomerase action in yeasts and mammals: Understanding telomeres and telomerase in cancer cells. *Open Biology*, 7, pp. 1–13. doi: 10.1098/rsob.160338.

Astuti, Y. *et al.* (2017). Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environmental Research*, 158, pp. 480–489. doi: 10.1016/j.envres.2017.06.038.

Aubert, G., Hills, M. and Lansdorp, P. M. (2012). Telomere length measurement—Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1–2), pp. 59–67. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003.

Baena, R. C. (2015). Muito além dos nutrientes : o papel dos fitoquímicos nos alimentos integrais. *Diagn Tratamento*, 20(11), pp. 17–21.

Baird, D. M. *et al.* (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature Genetics*, 33(2), pp. 203–207. doi: 10.1038/ng1084.

Ballew, B. J. and Savage, S. A. (2013). Updates on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Review of Hematology*, 6(3), pp. 327–337. doi: 10.1586/ehm.13.23.

Bär, C. and Blasco, M. A. (2016). Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *F1000Research*, 5, p. 89. doi: 10.12688/f1000research.7020.1.

Barrett, J. H. *et al.* (2015). Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. *Human Genetics*, 134(7), pp. 679–689. doi: 10.1007/s00439-015-1563-4.

Bębenek, A. and Ziuzia-Graczyk, I. (2018). Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Current Genetics*, pp. 1–12. doi: 10.1007/s00294-018-0820-1.

Behrens, Y. L. *et al.* (2017). Comparison of different methods for telomere length measurement in whole blood and blood cell subsets: Recommendations for telomere

length measurement in hematological diseases. *Genes Chromosomes and Cancer*, 56(9), pp. 700–708. doi: 10.1002/gcc.22475.

Bellon, M. and Nicot, C. (2017). Telomere dynamics in immune senescence and exhaustion triggered by chronic viral infection. *Viruses*, 9, p. 289. doi: 10.3390/v9100289.

Bertuch, A. A. (2016). The molecular genetics of the telomere biology disorders. *RNA Biology*, 13(8), pp. 696–706. doi: 10.1080/15476286.2015.1094596.

Brown, A. F. *et al.* (2014). A self-regulating template in human telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), pp. 11311–11316. doi: 10.1073/pnas.1402531111.

Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(10), p. 47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47.

Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), p. 21. doi: 10.1093/nar/gkn1027.

Chen, Y. and Zhang, Y. (2016). Pharmacology & Therapeutics Functional and mechanistic analysis of telomerase: An antitumor drug target. *Pharmacology and Therapeutics*, 163(76), pp. 24–47. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.017.

Cohen, S. *et al.* (2013). Childhood Socioeconomic Status, Telomere Length, and Susceptibility to Upper Respiratory Infection. *Brain Behav Immun*, 0, pp. 31–38. doi: 10.1016/j.bbi.2013.06.009.

Denham, J., Marques, F. Z. and Charchar, F. J. (2014). Leukocyte telomere length variation due to DNA extraction method. *BMC Research Notes*, 7(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/1756-0500-7-877.

Dey, A. and Chakrabarti, K. (2018). Current perspectives of telomerase structure and function in eukaryotes with emerging views on telomerase in human parasites. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), p. 333. doi: 10.3390/ijms19020333.

Dugdale, H. L. and Richardson, D. S. (2018). Heritability of telomere variation: It is all about the environment!. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*

*Sciences*, 373(1741). doi: 10.1098/rstb.2016.0450.

Fouquerel, E. and Opresko, P. L. (2017). Convergence of The Nobel Fields of Telomere Biology and DNA Repair. *Photochemistry and Photobiology*, 93(1), pp. 229–237. doi: 10.1111/php.12672.

Ganai, R. A. and Johansson, E. (2016). DNA Replication-A Matter of Fidelity. *Molecular Cell*. Elsevier, pp. 745–755. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.003.

Giassa, I. C. *et al.* (2018). Advances in the cellular structural biology of nucleic acids. *FEBS Letters*, 592(12), pp. 1997–2011. doi: 10.1002/1873-3468.13054.

Glousker, G. *et al.* (2015). Unraveling the Pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome, a Complex Telomere Biology Disorder. *Nature Rev Drug Discovery*, 4, pp. 457–471. doi: 10.1111/bjh.13442.

Gómez, D. L. M., Farina, H. G. and Gómez, D. E. (2013). Telomerase regulation : A key to inhibition?. *International Journal of Oncology*, 43(15), pp. 1351–1356. doi: 10.3892/ijo.2013.2104.

González-Giraldoa, Y. *et al.* (2016). Neuroprotective effects of the catalytic subunit of telomerase: A potential therapeutic target in the central nervous system. *Ageing Research Reviews*, 28, pp. 37–45. doi: 10.1016/j.arr.2016.04.004.

Gorbunova, V., and Seluanov, A. (2016). DNA double strand break repair , aging and the chromatin connection. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier, 788, pp. 2–6. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.01.007.

Hayashi, M. T. (2017). Telomere biology in aging and cancer. *Genes Genet. Syst.*, 92, pp. 107–118. doi: <http://doi.org/10.1266/ggs.17-00010>.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, pp. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Holohan, B., Wright, W. E. and Shay, J. W. (2014). Telomeropathies: An emerging spectrum disorder. *Journal of Cell Biology*, 205(3), pp. 289–299. doi: 10.1083/jcb.201401012.

Hou, L. *et al.* (2013). Air Pollution Exposure and Telomere Length in highly exposed

subjects in Beijing, China: A repeated-measure study. *NIH Public Access*, 5(312), pp. 1–17. doi: 10.1016/j.envint.2012.06.020.AIR.

Ivancich, M. *et al.* (2017). Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants*, 6(1), p. 15. doi: 10.3390/antiox6010015.

Jafri, M. A. *et al.* (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, 8(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s13073-016-0324-x.

Jäger, K. and Walter, M. (2016). Therapeutic targeting of telomerase. *Genes*, 7(7), pp. 1–24. doi: 10.3390/genes7070039.

Janicki-Deverts, D. *et al.* (2013). Association Between Telomere Length and Experimentally Induced Upper Respiratory Viral Infection in Healthy Adults. *JAMA*, 309(7), pp. 699–705. doi: 10.1001/jama.2013.613.

Khan, S. S., Singer, B. D. and Vaughan, D. E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*, 16(4), pp. 624–633. doi: 10.1111/acel.12601.

Kong, C. M., Lee, X. W. and Wang, X. (2013). Telomere shortening in human diseases. *FEBS Journal*, 280, pp. 3180–3193. doi: 10.1111/febs.12326.

Koyama, M. and Kurumizaka, H. (2018). Structural diversity of the nucleosome. *Journal of Biochemistry*, 163(2), pp. 85–95. doi: 10.1093/jb/mvx081.

Krebs, J., Goldstein, E. and Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's Genes XI*. XI. United States of America: Jones & Bartlett Learning. doi: 978-1-4496-5985-1.

Kunkel, T. A. and Erie, D. A. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annual Review of Genetics*, 49(1), pp. 291–313. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-054722.

Lai, T.-P., Wright, W. E. and Shay, J. W. (2018). Comparison of telomere length measurement methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 373(1741). doi: 10.1098/rstb.2016.0451.

Lai, T. P. *et al.* (2017). A method for measuring the distribution of the shortest telomeres

in cells and tissues. *Nature Communications*. Springer US, 8(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41467-017-01291-z.

Leão, R. *et al.* (2018). Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: Clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12929-018-0422-8.

Lenart, P. and Krejci, L. (2016). DNA, the central molecule of aging. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier B.V., 788, pp. 25–31. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.04.002.

Lin, J. *et al.* (2019). Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design. (99), pp. 271–278. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.005.Telomere.

Lipinska, N. *et al.* (2017). Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(22), pp. 4121–4132. doi: 10.1007/s00018-017-2573-2.

Marcomini, I. and Gasser, S. M. (2015). Nuclear organization in DNA end processing: Telomeres vs double-strand breaks. *DNA Repair*, 32, pp. 134–140. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.024.

Martens, D. S. and Nawrot, T. S. (2016). Air Pollution Stress and the Aging Phenotype: The Telomere Connection. *Current environmental health reports*, 3, pp. 258–269. doi: 10.1007/s40572-016-0098-8.

Martínez, P. and Blasco, M. A. (2015). Replicating through telomeres: A means to an end. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(9), pp. 504–515. doi: 10.1016/j.tibs.2015.06.003.

Martínez, P. and Blasco, M. A. (2017). Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *Journal of Cell Biology*, 216(4), pp. 875–887. doi: 10.1083/jcb.201610111.

Mason, P. J. and Perdignes, N. (2013). Telomere biology and translational research. *Translational Research*. Mosby, Inc., 162(6), pp. 333–342. doi: 10.1016/j.trsl.2013.08.009.

McCulloch, S. D. and Kunkel, T. A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Research*, 18(1), pp. 148–161. doi:

10.1038/cr.2008.4.

Mondello, C. and Chiodi, I. (2016). Telomere and telomerase stability in human diseases and cancer. *Frontiers in Bioscience*, 21(1), p. 4385. doi: 10.2741/4385.

Montpetit, A. J. *et al.* (2015). Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 63(4), pp. 289–299. doi: 10.1097/NNR.000000000000037.Telomere.

Müezziner, A., Zaineddin, A. K. and Brenner, H. (2014). Body mass index and leukocyte telomere length in adults: A systematic review and meta-analysis. *Etiology and Pathophysiology Body*, 15, pp. 192–201. doi: 10.1111/obr.12126.

Mundstock, E. *et al.* (2015). Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity*, 23, pp. 2165–2174. doi: 10.1002/oby.21183.

Needham, B. L. *et al.* (2013). Socioeconomic status, health behavior, and leukocyte telomere length in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Social Science and Medicine*. Elsevier Ltd, 85, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.socscimed.2013.02.023.

O’Callaghan, N. J. and Fenech, M. (2011). A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biological Procedures Online*. BioMed Central Ltd, 13(1), p. 3. doi: 10.1186/1480-9222-13-3.

Ozturk, M., Li, Y. and Tergaonkar, V. (2017). Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. *Antioxidants*, 6(1), p. 17. doi: 10.3390/antiox6010017.

Parks, J. W. and Stone, M. D. (2017). Single-Molecule Studies of Telomeres and Telomerase. 46, pp. 357–377. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-011256.

Quinlan, J. *et al.* (2014). Protocol for a systematic review of the association between chronic stress during the life course and telomere length. *BioMed Central*, 3, pp. 1–7. doi: 10.1186/2046-4053-3-40.

Ropio, J. *et al.* (2016). Telomerase activation in hematological malignancies. *Genes*, 7(9), p. 61. doi: 10.3390/genes7090061.

Rousseau, P. and Autexier, C. (2015). Telomere biology: Rationale for diagnostics and

therapeutics in cancer. *RNA Biology*, 12(10), pp. 1078–1082. doi: 10.1080/15476286.2015.1081329.

Schmidt, J. C. and Cech, T. R. (2015). Human telomerase : biogenesis , trafficking , recruitment , and activation. *Genes & Development*, 29, pp. 1095–1105. doi: 10.1101/gad.263863.115.GENES.

Shay, J. W. (2017). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discovery*, 6(6), pp. 584–593. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0062.Role.

Smith, S. (2018). Telomerase can't handle the stress. *Genes and Development*, 32, pp. 597–599. doi: 10.1101/gad.316042.118.

Stanley, S. E. and Armanios, M. (2015). The Short and Long Telomere Syndromes: Paired Paradigms for Molecular Medicine. *Curr Opin Genet Dev.*, 33, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.gde.2015.06.004.

Trinkle-Mulcahy, L. and Sleeman, J. E. (2017). The Cajal body and the nucleolus : “ In a relationship ” or “ It ’ s complicated ” ?”. *RNA Biology*. Taylor & Francis, 14(6), pp. 739–751. doi: 10.1080/15476286.2016.1236169.

Troy, N. M. and Bosco, A. (2016). Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respiratory Research*. Respiratory Research, 17, p. 156. doi: 10.1186/s12931-016-0474-9.

Venkatesan, S., Khaw, A. and Hande, M. (2017). Telomere Biology—Insights into an Intriguing Phenomenon. *Cells*, 6(2), p. 15. doi: 10.3390/cells6020015.

Vivante, A. *et al.* (2017). Genome organization in the nucleus: From dynamic measurements to a functional model. *Methods*, 123, pp. 128–137. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.01.008.

Walton, R. T. *et al.* (2016). Air pollution, ethnicity and telomere length in east London schoolchildren: An observational study. *Environment International*, 96, pp. 41–47. doi: 10.1016/j.envint.2016.08.021.

Wang, Y. and Feigon, J. (2017). Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, pp. 77–87. doi: 10.1016/j.sbi.2017.06.010.

Webb, C. J. and Zakian, V. A. (2016). Telomerase RNA is more than a DNA template. *RNA Biology*, 13(8), pp. 683–689. doi: 10.1080/15476286.2016.1191725.

Wu, R. A. *et al.* (2018). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 86(3), pp. 439–460. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045019.Telomerase.

Xu, Y. (2018). Recent progress in human telomere RNA structure and function. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, pp. 2577–2584. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.06.021.

Xu, Y. and Goldkorn, A. (2016). Telomere and telomerase therapeutics in cancer. *Genes*, 7(6), pp. 1–21. doi: 10.3390/genes7060022.

Zhang, X., Lou, X. and Xia, F. (2017). Advances in the detection of telomerase activity using isothermal amplification. *Theranostics*, 7(7), pp. 1847–1862. doi: 10.7150/thno.18930.

Zhu, H., Belcher, M. and van der Harst, P. (2011). Healthy aging and disease: role for telomere biology?. *Clinical Science*, 120, pp. 427–440. doi: 10.1042/cs20100385.