

A vida nas 'pontas'

O que mantém a estabilidade do material genético de geração em geração? Por cerca de 60 anos, a ciência buscou a resposta para essa pergunta aparentemente simples, mas com importantes conseqüências.

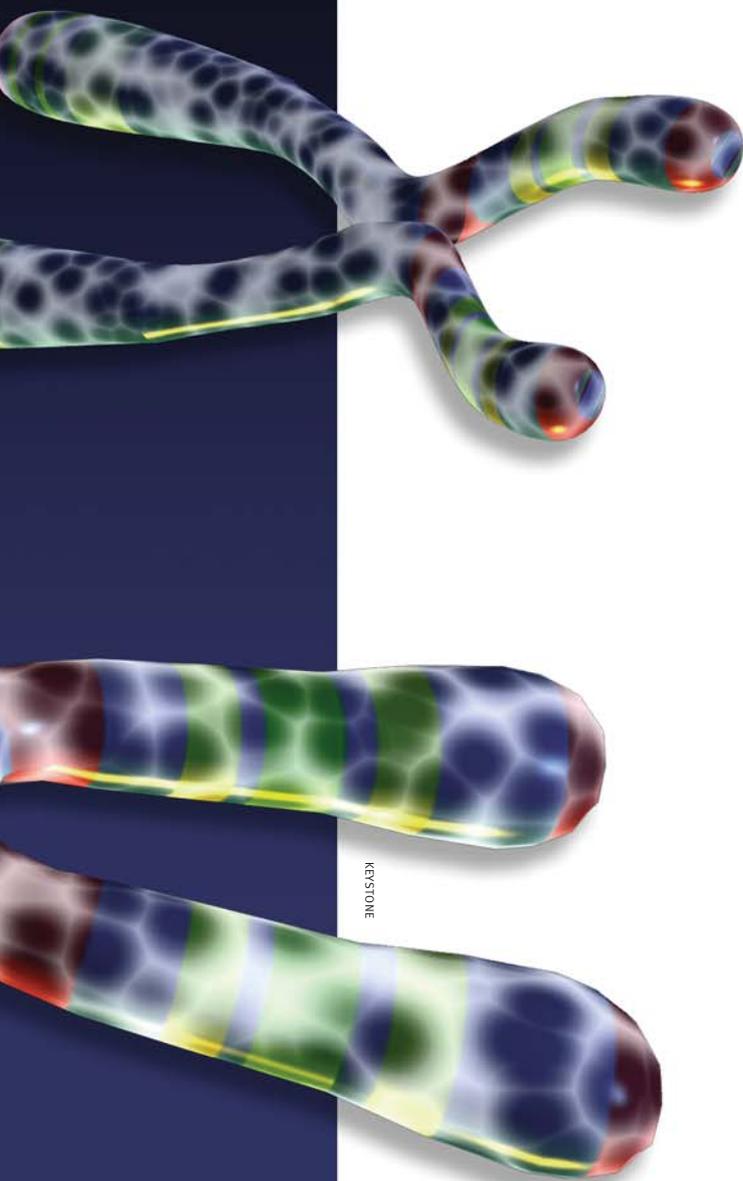
Ela foi encontrada na extremidade dos cromossomos, em um trecho de DNA que pode ser comparado à fita plástica que sela as pontas dos cadarços de um sapato. Esse trecho, que ganhou o nome de telômero, tornou-se desde sua descoberta o foco de atenção de uma das áreas mais instigantes da pesquisa biológica.

Maria Isabel Nogueira Cano

*Departamento de Genética, Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista (Botucatu)*



dos cromossomos



KEystone

Todo o material genético contido no núcleo de uma célula, seja de um organismo unicelular (como protozoários e vários fungos e algas) ou multicelular (como insetos, plantas, répteis, mamíferos e outros), está compactado em estruturas denominadas cromossomos, termo que significa ‘corpos coloridos’ (do grego *chroma* = cor e *soma* = corpo). Os cromossomos, que variam em tamanho, forma e número em cada uma das diferentes espécies, são compostos essencialmente de DNA e proteínas associadas. Neles, portanto, está toda a informação genética que caracteriza e diferencia tanto as células e os tecidos quanto todos os seres vivos.

Essas informações são transmitidas pelos diferentes seres às novas gerações, que para crescer multiplicam suas células em um processo denominado mitose. Na mitose, uma célula-mãe, após duplicar toda a sua estrutura, inclusive os cromossomos, divide-se originando duas células-filhas idênticas a ela. Para que toda a informação genética seja transmitida com sucesso, os cromossomos devem ser cópias fiéis dos que estavam na célula-mãe. O DNA existente em um cromossomo contém os genes, mensagens codificadas na forma de seqüências de nucleotídeos (‘tijolos’ básicos que compõem o material genético das células), onde estão as instruções para a formação de todas as células e tecidos do nosso corpo e para a síntese de proteínas (responsáveis por todos os processos biológicos), além de outras seqüências capazes de sintetizar ‘mensageiros’ que atuam na regulação de processos celulares e áreas que não carregam qualquer tipo de instrução, ou codificação. ▶

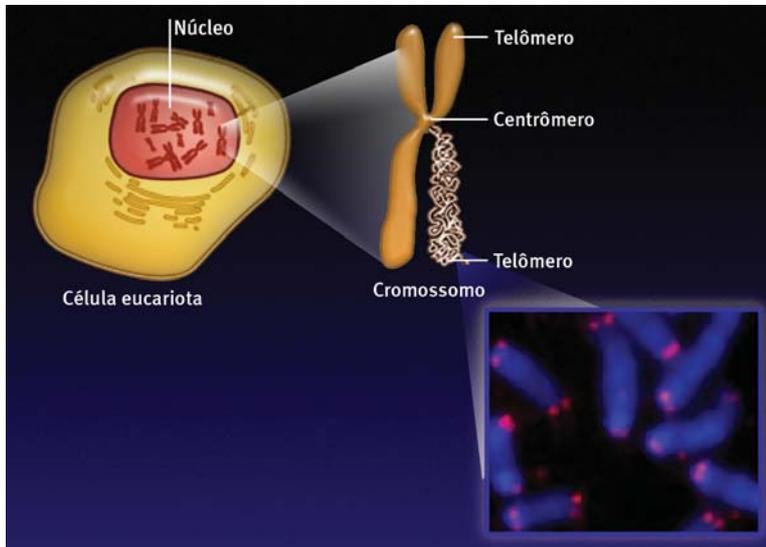


Figura 1. Localização dos centrômeros e dos telômeros em cromossomos humanos: na ilustração, as linhas indicam a posição dos centrômeros e dos telômeros no cromossomo, e no detalhe (fotografia) os cromossomos aparecem com seu corpo corado em azul e os telômeros, situados em suas ‘pontas’, corados em rosa

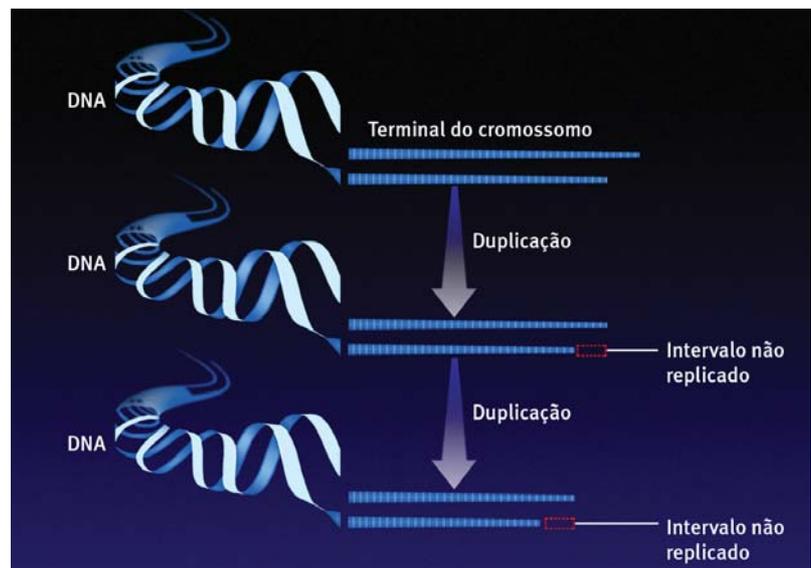
Entre as estruturas que o DNA não-codificador forma nos cromossomos estão os centrômeros e os telômeros. Os centrômeros permitem a separação exata dos cromossomos duplicados durante a divisão celular que gera as células-filhas. Já os telômeros (do grego *telos* = fim e *meros* = parte), localizados nas ‘pontas’ dos cromossomos, funcionam como capas protetoras dessas extremidades, tendo papel muito importante na manutenção da integridade do genoma. Eles impedem, por exemplo, a fusão de terminais de diferentes cromossomos e a degradação destes por enzimas que, na falta dos terminais, reconheceriam o material cromossômico como DNA danificado (figura 1). Em nossos sapatos, quando os pedaços de fita adesiva que selam as pontas dos cadarços se desprendem, estes começam a desfiar,

desmanchando-se. Em uma célula, ocorre o mesmo com os cromossomos que têm seus telômeros danificados: eles tendem a ser destruídos e, nesse processo, a célula morre.

Primeiras pesquisas sobre telômeros

O interesse pela compreensão das propriedades dos telômeros começou no final dos anos 1930, com trabalhos pioneiros dos geneticistas norte-americanos Hermann Müller (1890-1967) e Barbara McClintock (1902-1992) – bem antes, portanto, que o médico

Figura 2. O problema da replicação nos terminais dos cromossomos: na maioria das células, a extremidade de uma das fitas do cromossomo (fita de baixo, no desenho) fica mais curta a cada divisão celular porque as enzimas que duplicam o DNA não conseguem finalizar sua síntese. Isso ocorre porque a parte da molécula dessas enzimas que se liga à extremidade do DNA para iniciar a síntese é degradada ao final do processo, deixando um fragmento sem fita complementar (indicado pelo retângulo em vermelho)



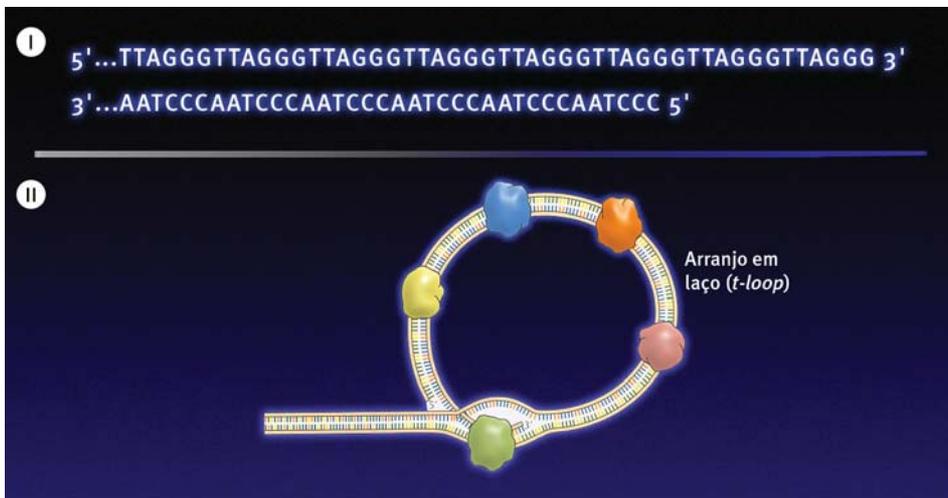


Figura 3. Os telômeros humanos apresentam uma seqüência de nucleotídeos em que o terminal da fita mais longa do DNA (em cima) é rico em guanina (letra 'G'), e a fita mais curta (em baixo) é complementar à primeira e rica em citosina (letra 'C'). Os telômeros são encontrados com esse terminal 'livre' (I) ou formando um arranjo em laço (*t-loop*, em inglês) (II), presente nos cromossomos de alguns eucariotos (os corpos coloridos representam proteínas teloméricas que mantêm essa estrutura)

canadense (radicado nos Estados Unidos) Oswald Avery (1877-1955) identificasse, em 1944, o DNA como o material hereditário. Muller e McClintock definiram os telômeros como estruturas funcionais que protegem os terminais dos cromossomos.

Com a descoberta, em meados dos anos 50, dos princípios que regem a duplicação do DNA e a revelação de que as enzimas responsáveis pelo processo não são capazes de finalizar a replicação dos terminais dos cromossomos (figura 2), um novo dogma surgiu na biologia, trazendo várias questões não menos importantes. A pergunta principal era: "Como a replicação do DNA é finalizada nos terminais dos cromossomos?" Isso porque era sabido que, se esses trechos não fossem mantidos, em cada evento de replicação as células perderiam porções de cromossomos a partir das extremidades. Assim, imaginando que cada porção perdida tivesse 16 repetições da seqüência TTAGGG (as letras representam grupos químicos componentes do DNA) e que os telômeros contivessem duas mil repetições dessa seqüência, ao final de 125 divisões celulares eles desapareceriam por completo. E que destino teriam as células com cromossomos progressivamente mais curtos? Por terem um genoma menor e totalmente instável, elas provavelmente entrariam em um estado irreversível de incapacidade de proliferação conhecido como senescência replicativa ou envelhecimento celular, como veremos adiante.

Dois biólogos, o norte-americano James Watson e o russo Alexei Olovnikov, foram os primeiros a propor, no início dos anos 70, possíveis soluções para esse caso. Eles descobriram que moléculas circulares de DNA evitam o problema juntando-se e formando um colar antes da replicação, sem deixar terminais livres. Olovnikov sugeriu, inclusive, que as perdas de DNA nos terminais dos cromossomos

seriam responsáveis por uma limitação da capacidade replicativa das células humanas – o que é reconhecido hoje como uma das principais funções dos telômeros.

Para entender melhor essas estruturas terminais, a bioquímica australiana (naturalizada norte-americana) Elizabeth H. Blackburn, durante seu doutorado na Universidade Yale, em meados dos anos 70, no laboratório do biólogo norte-americano Joseph Gall, seqüenciou os telômeros de ciliados (protozoários unicelulares) e descobriu que eles são formados por centenas de repetições de DNA que, em uma fita, têm a seqüência de nucleotídeos 5'-GGGGTT-3', e na fita complementar exibem a seqüência 5'-CCCCAA-3' – as duas fitas do DNA são complementares ('C' sempre faz par com 'G' e 'A' com 'T') e dispostas em antiparalelo (os números 5' e 3' indicam, por convenção, as extremidades das fitas e a síntese do DNA ocorre sempre no sentido 5' → 3'). Hoje, sabe-se que todos os telômeros terminam com uma extensão curta da repetição telomérica (figura 3A) rica em nucleotídeos formados pela base guanina (G). Está provado experimentalmente que essa extensão forma um tipo mais complexo de arranjo, em laço (figura 3B), em pelo menos metade dos cromossomos de mamíferos, de leveduras (fungos) e de tripanossomas (protozoários).

Embora os achados de Blackburn e Gall não tenham resolvido de imediato a questão do término da replicação do DNA, eles deram pistas para que se comprovasse a conservação dessas estruturas durante a evolução. Bastou identificar os telômeros de organismos evolutivamente distantes e comparar suas seqüências para confirmar isso. Os telômeros de humanos e de alguns protozoários primitivos (como leishmanias e tripanossomas), por exemplo, são formados pela seqüência 5'-TTAGGG-3'. ▶

Surge a solução: a descoberta da telomerase

A primeira pista de que algum fenômeno especial possibilitava a replicação dos terminais de cromossomos surgiu em 1982. O bioquímico norte-americano David Prescott mostrou que, durante uma das fases de desenvolvimento de ciliados, seu genoma se fragmenta e, nesse momento, seqüências teloméricas são adicionadas aos terminais dos cromossomos.

Dois anos depois, outros achados comprovaram esse processo. Duas pesquisas nos Estados Unidos revelaram que seqüências teloméricas do ciliado *Tetrahymena* podiam substituir os telômeros da levedura *Saccharomyces* e que esta também era capaz de adicionar suas repetições teloméricas aos terminais dos cromossomos desse ciliado. Um terceiro achado, de um grupo de cientistas holandeses, mostrou que telômeros de tripanossomas que causam a doença do sono ficavam progressivamente mais longos a cada divisão celular durante a infecção no hospedeiro mamífero. Todos esses resultados indicavam claramente que os terminais dos cromossomos ganhavam seqüências por um mecanismo aparentemente comum a organismos diferentes e, ao mesmo tempo, especial e desconhecido.

Várias hipóteses foram então lançadas para explicar essa ‘regeneração’ dos telômeros, até que em 1985, na Universidade da Califórnia (em Berkeley), a bióloga norte-americana Carol Greider, estudante de doutorado sob orientação de Elizabeth Blackburn, descobriu uma enzima que adicionava DNA telomérico aos terminais dos cromossomos de *Tetrahymena*. A enzima ganhou o nome sugestivo de telomerase. Essas pesquisadoras, e depois vários outros cientistas, mostraram experimentalmente que a telomerase é formada por um componente protéico – um tipo de enzima denominado transcriptase reversa – e por uma molécula de RNA, que contém o molde invertido (uma seqüência de nucleotídeos complementar) da seqüência telomérica rica em guanina encontrada nos terminais de todos os cromossomos. O componente protéico faz a cópia complementar desse molde e a adiciona ao terminal 3’ dos cromossomos. Quando a adição de uma repetição inteira é finalizada, a telomerase desloca-se ao longo da extremidade do cromossomo e posiciona-se de forma a reiniciar a síntese (figura 4).

O descobrimento da telomerase resolveu o problema da replicação dos trechos terminais de moléculas lineares de DNA. E a atividade dessa enzima foi detectada em inúmeros organismos, de mamíferos a leveduras, incluindo os protozoários que causam malária, leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono. Além disso, demonstrou-se que organismos ou células com mutações nos genes que codificam o componente protéico e o RNA da te-

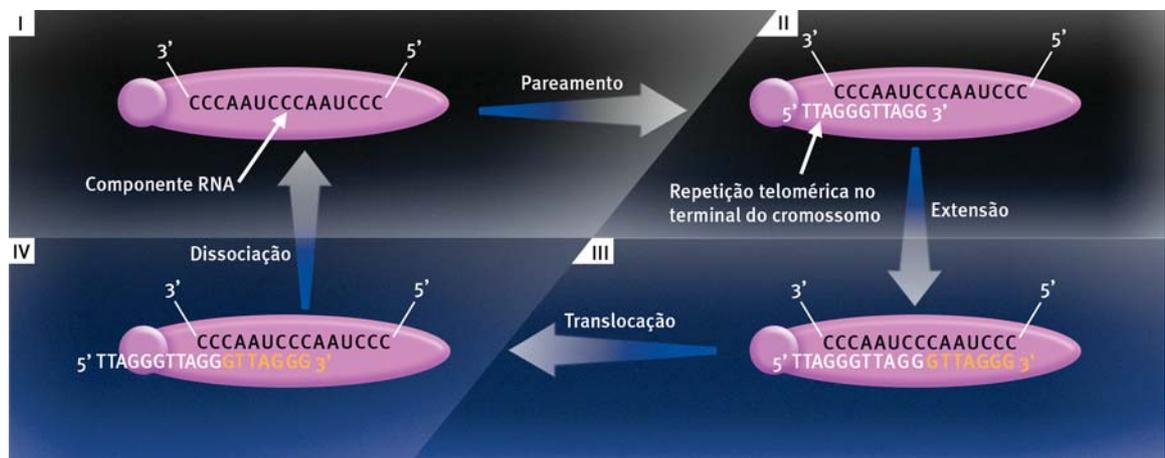
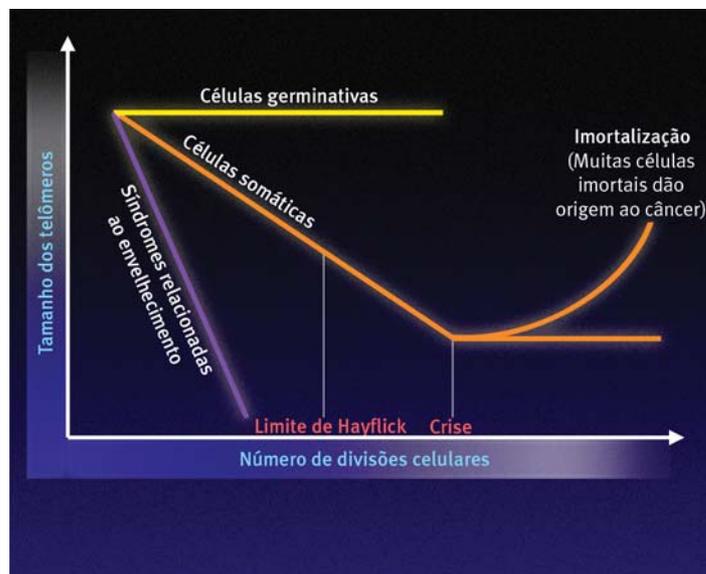


Figura 4. Replicação dos telômeros. A telomerase (I) é formada por um componente protéico (estrutura em roxo) e por uma molécula de RNA (seqüência de letras, em preto), que contém uma seqüência-molde, complementar a mais de uma repetição telomérica (seqüência em branco, em II). Quando a telomerase liga-se ao telômero (III), ocorre o pareamento dos nucleotídeos deste e do molde contido no RNA, ligando citosina com guanina (C-G) e uracila com alanina (U-A) (em moléculas de RNA, a timina encontrada no DNA é substituída por uracila), e novos nucleotídeos (em amarelo) são adicionados ao telômero. Em cada ciclo de replicação, uma nova repetição telomérica (a seqüência TTAGGG) surge no fim do cromossomo. Em seguida, a telomerase desloca-se sobre o telômero (IV) para iniciar um novo ciclo de replicação ou desliga-se do cromossomo, encerrando sua ação

Figura 5. Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular: células germinativas (não diferenciadas – linha amarela) têm telômeros longos e multiplicam-se indeterminadamente, enquanto células somáticas (já diferenciadas – linha laranja) dividem-se por 50-60 gerações e perdem seus telômeros gradualmente (o ‘limite de Hayflick’ é o momento em que a maioria das células somáticas mostra sinais de envelhecimento). Células ‘em crise’ que já acumularam diferentes mutações morrem ou reativam a telomerase, tornando-se ‘imortais’. O encurtamento acelerado dos telômeros (linha roxa) ocorre em muitas síndromes relacionadas ao envelhecimento prematuro. Indivíduos portadores dessas síndromes apresentam precocemente patologias associadas apenas a idosos



lomecase perdem a capacidade de se dividir e envelhecem rapidamente, comprovando a importância biológica da enzima.

Telomerase e proliferação celular

A maioria das células humanas somáticas (ou seja, já diferenciadas) apresenta normalmente pouca ou nenhuma atividade de telomerase. Isso significa que, embora essas células contenham o gene que codifica a enzima, ele está silencioso (inativo), não sendo capaz de produzi-la. Portanto, tais células se dividem por apenas 50 a 60 gerações antes que seus telômeros fiquem muito curtos para dar proteção aos cromossomos. Quando alguns desses terminais chegam a um limite mínimo de tamanho (característico para cada célula), isso sinaliza a parada das divisões celulares e o início do envelhecimento. Esse ponto crítico, conhecido como ‘limite de Hayflick’ (figura 5), é uma das razões que explicam por que não podemos viver para sempre!

Existem, porém, células normais com alta capacidade proliferativa, como células germinativas jovens (esperma e óvulo não maduros), células-tronco embrionárias e algumas células somáticas. Entre estas estão as células endoteliais (que revestem o coração e os vasos sanguíneos e linfáticos), as células endometriais (que revestem o útero) em adultos e os linfócitos T e B (tipos de glóbulos brancos) quando induzidos à proliferação. Nestas, ao contrário do que ocorre na maioria das células somáticas, a telomerase se mantém ativa.

Entretanto, aquelas células que não têm esse poder de proliferação e que transpõem o chamado limite de ‘crise’ reativam a atividade de telomerase e continuam a se dividir indefinidamente. Tais células são consideradas ‘imortais’, e isso é o que acontece com 85% a 90% das células cancerígenas.

A atividade ininterrupta da telomerase verificada nas células tumorais também é encontrada na maioria dos eucariotos (organismos cujas células têm núcleo definido) unicelulares. Assim, tais organismos também apresentam uma capacidade infinita de multiplicação quando em condições propícias no meio ambiente ou no hospedeiro, sendo considerados ‘imortais’. Essa condição só pode ser alterada se eles estiverem em meio não adequado para sua sobrevivência.

O papel dos telômeros no câncer

Como foi mostrado, a capacidade proliferativa das células está diretamente associada à atividade da telomerase. Assim, células somáticas senescentes que passaram a se dividir indefinidamente apresentam alta atividade de telomerase e perda de controle sobre o ciclo celular. Aliado a isso elas têm telômeros curtos e acumulam vários tipos de mutações (figura 5). Em consequência, a cada divisão celular ocorre uma diminuição gradual da integridade de seus cromossomos, levando à instabilidade do genoma e, por isso, ao acionamento da maquinaria de reparo da célula. Esta interpreta que o DNA cromossômico está defeituoso ou quebrado e passa ▶

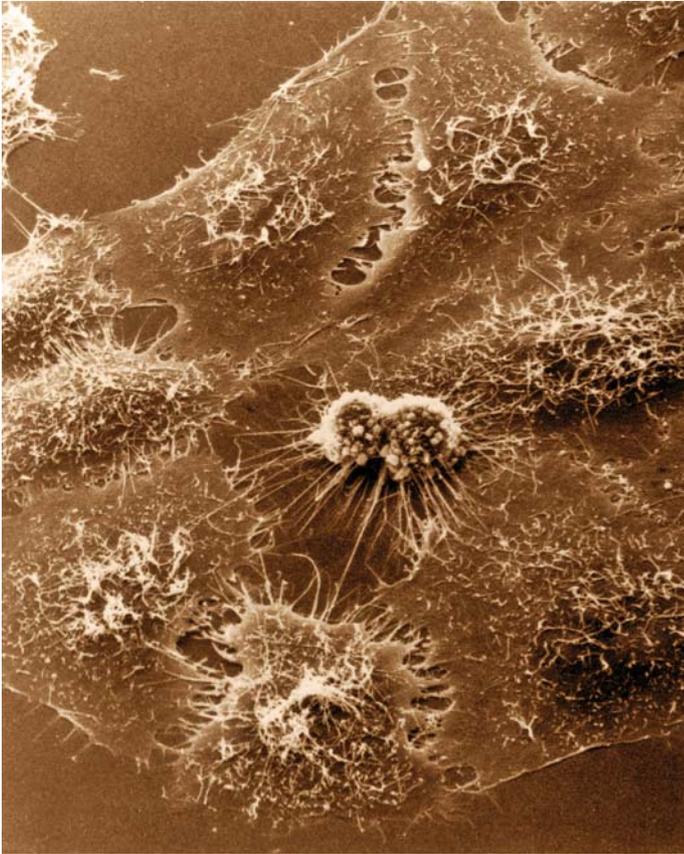


Figura 6. Células HeLa em cultura dividindo-se, em imagem obtida com microscópio eletrônico

ainda são utilizadas em laboratório, já que é possível mantê-las indefinidamente em frascos de cultura (figura 6).

Como a telomerase é necessária para a imortalização da maioria das células de tumores e importante para a multiplicação de organismos unicelulares, essa enzima é considerada um bom alvo para o desenvolvimento não só de drogas contra o câncer e outras doenças, mas também de métodos não-invasivos de diagnóstico precoce do câncer. Terapias experimentais que visam inibir a ação da telomerase têm sido aplicadas em animais de laboratório e algumas já começam a ser testadas em pacientes humanos. Alterações nos genes que instruem a síntese dos componentes da telomerase e outros métodos também poderão, no futuro, dar origem a tratamentos para doenças (ver ‘Mais pêlos em camundongos’ e ‘Telômeros e leishmaniose’).

a reparar esses danos promovendo, por exemplo, a fusão entre os terminais. Ao que parece, é a somatória desses efeitos que determina uma das primeiras etapas do desenvolvimento de alguns tipos de câncer e a formação de tumores.

Um exemplo de que células cancerígenas são imortais é a linhagem celular denominada HeLa, originada de células extraídas em 1951 de um câncer cervical da norte-americana Henrietta Lacks (1920-1951). Mais de 50 anos depois, essas células

A inibição da telomerase, no entanto, não poderá ser usada como terapia nos 10% a 15% de tumores malignos em que a telomerase não é reativada. Essas células cancerígenas usam um mecanismo conhecido como ‘alongamento alternativo dos telômeros’ (ALT, na sigla em inglês), que adiciona novas seqüências aos terminais cromossômicos permutando DNA entre telômeros de cromossomos diferentes. Esse processo já havia sido proposto há muitos anos,

MAIS PÊLOS EM CAMUNDONGOS

Pesquisadores da Universidade Stanford, nos Estados Unidos, mostraram, em artigo publicado recentemente pela revista científica britânica *Nature*, os efeitos provocados pela ativação localizada de um gene extra do componente protéico da telomerase em um camundongo. Esse gene foi ativado especificamente em células epiteliais presentes na pele do animal. Isso resultou em rápida transição do ciclo de crescimento dos pêlos, levando à proliferação de células-tronco que estavam em repouso na região do folículo piloso (estrutura que dá origem ao pêlo). Após algum tempo, os animais transgênicos estavam abundantemente peludos, se comparados aos não transgênicos. Como essa função da telomerase não envolve o componente RNA, pode ser considerada um mecanismo independente de manutenção dos telômeros, o que abre a possibilidade de que, no futuro, essa enzima também seja utilizada em terapias para a recuperação de queimados e de doenças associadas a danos nos tecidos e ao envelhecimento.

TELÔMEROS E LEISHMANIOSE

O Laboratório de Telômeros do Departamento de Genética da Universidade Estadual Paulista em Botucatu é pioneiro em pesquisas com telômeros de protozoários patogênicos, principalmente os causadores da leishmaniose em humanos e animais domésticos. O objetivo é encontrar meios de utilizar a telomerase e outras proteínas teloméricas como novos e potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias, incluindo o desenho de drogas de baixa toxicidade para o hospedeiro e mais eficazes no combate à doença. A leishmaniose, doença infecciosa transmitida pela picada de um inseto, pode se manifestar de diferentes formas clínicas e é mais grave em hospedeiros com o sistema imunológico enfraquecido. O número crescente de casos da doença em transplantados e em portadores do vírus HIV tem alarmado as comunidades médica e científica. Além disso, a Organização Mundial da Saúde considera a leishmaniose uma das doenças cuja incidência mais cresce na atualidade (juntamente com a dengue e a malária), pois para ela não existem métodos eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento.

quando ainda se discutia como eram mantidos os terminais dos cromossomos.

O relógio molecular das células

O envelhecimento celular – ou senescência – é um processo que ocorre constantemente com a maioria das células somáticas humanas e com alguns microrganismos eucariotos que se multiplicam por divisão celular simples. Esse processo ocorre após um número determinado de gerações e se caracteriza por perda da capacidade de divisão, estresse oxidativo (acúmulo no organismo de radicais livres, grupos químicos altamente reativos capazes de destruir moléculas orgânicas) e ausência da atividade de telomerase.

Resultados de muitas pesquisas sugerem que o encurtamento dos telômeros funciona como um relógio molecular que registra quantas vezes as células se duplicaram (ver ‘Telômeros: relógios do envelhecimento’, em *CH* nº 137). Quando esse encurtamento atinge um ponto crítico, o crescimento celular é interrompido, culminando na senescência e na indução da morte da célula. Acredita-se que telômeros curtos em células que ainda têm capacidade proliferativa seriam responsáveis por alguns dos fenômenos que associamos ao envelhecimento normal. Em geral, o que se sabe é que, em cultura, células de um feto dividem-se mais vezes que as de uma criança, que por sua vez dividem-se mais vezes que as de um adulto.

A primeira evidência direta de que o tamanho dos telômeros determina a capacidade proliferativa

das células humanas surgiu no final dos anos 90, em experimentos realizados pela corporação norte-americana Geron. Seus pesquisadores introduziram um gene ativo da telomerase em fibroblastos humanos normais (células do tecido conjuntivo que produzem substâncias importantes para a sustentação do corpo, como colágeno e elastina). Nos fibroblastos, o gene da telomerase normalmente está inativo. Com a expressão desse gene ativo, essas células voltaram a apresentar atividade de telomerase e aumentaram muito o número limite de duplicações em cultura, de 60 para quase uma centena. Além disso, essas células mantiveram o número correto de cromossomos, continuaram crescendo de forma normal e não apresentaram sinais de carcinogênese.

Essa função dos telômeros ficou mais clara com a clonagem da ovelha Dolly, nascida em 1996, a partir de células de glândula mamária de ovelha adulta (células somáticas). Dolly nasceu com telômeros menores que os de animais concebidos de forma natural e, aos seis anos, já apresentava artrite e doença pulmonar progressiva, enfermidades incomuns para sua idade cronológica.

Vale mencionar que indivíduos acometidos por doenças genéticas como a síndrome de Werner (causada por deficiências na maquinaria de reparo envolvida com os telômeros) e disqueratose congênita (DKC, causada por uma deficiência na telomerase) apresentam envelhecimento prematuro. Entretanto, ainda não está totalmente claro se o tamanho dos telômeros está relacionado à idade biológica de indivíduos normais. A principal função da telomerase, portanto, parece ser a manutenção da estabilidade dos telômeros e das divisões celulares, o que pode levar a importantes descobertas relacionadas ao processo de envelhecimento e ao reparo de tecidos danificados. ■

SUGESTÕES PARA LEITURA

- BLACKBURN, E.H.
‘The end of the (DNA) line’, in *Nature Structural Biology*, v. 7, p. 847, 2000.
- BLASCO, M.A.
‘Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond’, in *Nature Reviews Genetics*, v. 6, p. 611, 2005.
- CANO, M.I.N.
‘Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers’, in *Trends in Parasitology*, v. 17(9), p. 425, 2001.
- LEWIS, J.; ALBERTS, B. & BRAY, D.
Biologia molecular da célula, Porto Alegre, Artmed, 2004.