

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM  
MEDICINA LEGAL

# Marcadores Moleculares de Envelhecimento: O Comprimento dos Telómeros em Doenças Associadas à Idade

Inês Marques Rodrigues Figueiredo Oliveira

**M**  
2018



Marcadores Moleculares de Envelhecimento:  
O Comprimento dos Telómeros em Doenças Associadas à Idade  
Inês Marques Rodrigues Figueiredo Oliveira



INÊS MARQUES RODRIGUES FIGUEIREDO OLIVEIRA

## **Marcadores Moleculares de Envelhecimento: O Comprimento dos Telómeros em Doenças Associadas à Idade**

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

**Orientador** – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

**Categoria** – Professor Afiliado

**Afiliação** – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

**Co-orientadora** – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

**Categoria** – Investigadora Pós-Doutoramento, Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

**Afiliação** – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

**Co-orientadora** – Mestre Mariana Gomes Morais

**Categoria** – Aluna de Doutoramento

**Afiliação** – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto



*“How old would you be  
if you didn’t know how old you are?” – Satchel Paige*



## AGRADECIMENTOS

Após dois anos da minha chegada à bela cidade do Porto e ao ICBAS, concluo esta etapa do meu percurso académico com a certeza de que esta foi a melhor opção que podia ter tomado para a minha vida. Gostaria de agradecer a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador um muito obrigado por ter aceite a orientação científica deste trabalho e por me ter proposto este projeto tão desafiante.

À Doutora Ana Luísa Teixeira, minha co-orientadora tenho que agradecer imenso por toda a simpatia e apoio que me deu nesta fase final, por todo o saber partilhado, opiniões e críticas construtivas e ainda pelo auxílio imprescindível na análise estatística deste trabalho. A sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento do meu raciocínio científico e pensamento crítico.

À Mestre Mariana Morais, minha co-orientadora pelo apoio incondicional na realização desta tese. Obrigado por todos os segundos que lhe dedicaste! Estiveste presente desde o início ao fim, sempre com uma palavra amiga e de incentivo. Um obrigado do tamanho do mundo pela paciência que tiveste comigo, pelo conhecimento partilhado e por me teres ajudado a crescer a nível científico e laboratorial. Sem ti, não teria conseguido concretizar nem as minhas ideias nem este projeto.

A todos os colegas do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, obrigado por me terem aberto as portas do laboratório e acolhido tão bem durante estes meses. Foi muito importante para mim fazer parte desta equipa, aprendi imenso com todos vocês.

À minha amiga e colega de mestrado Andreia Ribeiro, a única do nosso grupo de 8 que decidiu continuar esta aventura comigo. Não nos limitámos à pós-graduação, nós fomos em frente e por fim, conseguimos! Não irei esquecer os bons momentos que partilhámos no laboratório. Tantas foram as conversas sobre ciência e não só, até durante a preparação dos PCR's para aliviar as dores no polegar. Esta nossa amizade de apenas 2 anos não se irá perder, "Qué Flô" para sempre!

Às minhas melhores amigas, por acreditarem sempre em mim. O vosso apoio é e sempre será fundamental em todos os momentos da minha vida. Agradeço a vossa

preocupação com a minha sanidade mental por me terem oferecido uma massagem de relaxamento, irei finalmente após a entrega da tese usufruir do meu maravilhoso presente de aniversário.

Ao meu namorado Filipe, pelo amor, carinho e força que me transmites todos os dias. Obrigado por estares presente nos bons e nos maus momentos, por me fazeres acreditar que sou capaz de alcançar todos os meus sonhos e por me fazeres rir mesmo quando as coisas não correm bem. És a minha pessoa especial!

Ao meu irmão Pedro, o futuro Sr. Doutor, por me acompanhares nas tardes e noites de estudo, tu com anatomia e eu com a minha tese. Obrigado por me fazeres rir com as histórias hilariantes da faculdade de medicina e da tua aventura como caloiro. O teu apoio científico e não só e a motivação que me transmitiste foi muito importante nesta jornada.

À minha família em geral, mas um especial agradecimento aos meus pais pelo apoio incondicional e por todos os valores que me inculcaram. Obrigado por toda a vossa ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A vocês devo a minha vida e todos os meus sucessos. Nunca conseguirei agradecer o suficiente todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim diariamente. A vocês dedico este trabalho!

## LISTA DE ABREVIATURAS

### A

AFAR – *American Federation of Aging Research*

ALT – *Alternative Lengthening of Telomeres*

aTL – *absolute Telomere Length*

AVC – Acidente Vascular Cerebral

### C

CaP – Cancro da Próstata

Ct – *Cycle Threshold*

### D

DGS – Direção Geral de Saúde

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

### F

FDA – *Food and Drug Administration*

### G

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

### H

HBB – Beta-Globina Humana

### I

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IC 95% – Intervalo de Confiança a 95%

IMC – Índice de Massa Corporal

**K**

kb – kilobases

**N**

ng/μL – Nanogramas por Microlito

nM – nanoMolar

**O**

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

**P**

pb – pares de bases

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PGAs – Produtos finais de Glicosilação Avançada

PSA – *Prostate specific antigen*

POT1 – *Protection of telomeres 1*

**Q**

qPCR – quantitative *Polymerase Chain Reaction*

Q-FISH – *Quantitative fluorescence in situ hybridization*

**R**

RAP1 – *Repressor Activator Protein 1*

RNA – *Ribonucleic Acid*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

**S**

SEF – Serviço de Estrangeiros e Fronteiras

STELA – *Single Telomere Length Analysis*

**T**

TACI – *Total Anterior Circulation Infarct*

TEP1 – *Telomerase Associated Protein 1*

TERC – *Telomerase RNA Component*

TERT – *Telomerase Reverse Transcriptase*

TIN2 – *TRF1-Interacting Nuclear Protein 2*

TPP1 – *Tripeptidyl Peptidase 1*

TRF – *Terminal Restriction Fragment*

TRF1 – *Telomere Repeat Binding Factor 1*

TRF2 – *Telomere Repeat Binding Factor 2*

**X**

X<sup>2</sup> – Qui-quadrado



**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	27
1.1 Envelhecimento: Idade Cronológica <i>versus</i> Idade Biológica.....	27
1.2 Marcadores moleculares e o envelhecimento.....	31
1.3 Biologia dos Telómeros .....	34
1.4 Comprimento dos telómeros como biomarcador molecular de envelhecimento .....	36
1.5 Medição do comprimento dos telómeros .....	38
1.6 Patologias relacionadas com o encurtamento dos telómeros .....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	47
2.1 Objetivo Geral .....	47
2.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
3.1 População em estudo.....	51
3.2 Extração de DNA Genómico.....	52
3.3 Quantificação relativa do comprimento dos telómeros por qPCR .....	53
3.4 Análise Estatística .....	54
<b>4. RESULTADOS</b> .....	57
4.1 Qualidade da amostra de DNA e frequência de deteção do fragmento de interesse.....	57
4.2 Análise do comprimento dos telómeros no Grupo Controlo .....	58
4.3 Análise do comprimento dos telómeros no Grupo CaP .....	61
4.4 Análise do comprimento dos telómeros no Grupo AVC .....	64
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS</b> .....	79
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 – Representação da atividade da telomerase ao longo da vida (adaptado de Hiyama e colaboradores (39)).....	35
Figura 2 – Representação esquemática dos processos (A) de senescência celular, consequente diminuição do tamanho dos telómeros e risco de desenvolvimento de doenças, e (B) da biologia do telómero e da manutenção do seu comprimento (adaptado de Almeida e colaboradores (1)). .....	38
Figura 3 – Quantidade (ng/μL) e pureza de DNA das amostras em estudo nos diferentes grupos de indivíduos. ....	57
Figura 4 - Percentagem de deteção da região de DNA de interesse nos diferentes grupos de indivíduos em estudo. ....	58
Figura 5 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo segundo os grupos etários definidos (média ± desvio padrão). ....	59
Figura 6 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo de acordo com a variável género (média ± desvio padrão). ....	59
Figura 7 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo segundo a variável hábitos tabágicos em indivíduos com idade inferior a 36 anos (média ± desvio padrão). .....	60
Figura 8 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo segundo a variável hábitos tabágicos em indivíduos com idade superior ou igual a 36 anos (média ± desvio padrão). ....	61
Figura 9 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controlo <i>versus</i> grupo CaP (média ± desvio padrão).....	62
Figura 10 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo CaP segundo a variável hábitos tabágicos (média ± desvio padrão). ....	63
Figura 11 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controlo <i>versus</i> grupo AVC, no género feminino (média ± desvio padrão). ....	64

Figura 12 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controlo *versus* grupo AVC, no género masculino (média  $\pm$  desvio padrão).....65

Figura 13 - Comprimento dos telómeros no grupo AVC segundo a variável hábitos tabágicos, no género feminino (média  $\pm$  desvio padrão). .....66

Figura 14 - Comprimento dos telómeros no grupo AVC segundo a variável hábitos tabágicos, no género masculino (média  $\pm$  desvio padrão).....67

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Métodos de medição do comprimento dos telómeros e suas respectivas vantagens e desvantagens. ....41

Tabela 2- Distribuição das frequências de telómeros no grupo controlo e no grupo de CaP de acordo com o seu comprimento e análise de OR. ....63

Tabela 3- Distribuição das frequências de telómeros no grupo controlo e no grupo de AVC de acordo com o seu comprimento e análise de OR.....66



# RESUMO





## RESUMO

O estabelecimento da idade dos indivíduos é fundamental na área da Medicina Legal e Ciências Forenses, uma vez que contribui para o seu processo de identificação. O envelhecimento da população humana é um processo complexo que ocorre gradualmente, diferindo de indivíduo para indivíduo. O indicador mais comum na avaliação do processo de envelhecimento é a idade cronológica, que indica o tempo de vida que o indivíduo possui contado a partir do seu nascimento. Porém, a determinação da idade cronológica pode não ser suficiente nas várias áreas da Medicina Legal. Sendo assim, a determinação da idade biológica pode ser um complemento útil à idade cronológica, já que indivíduos com a mesma idade podem apresentar diferentes níveis de disfunções e vulnerabilidades à medida que vão envelhecendo e por isso, apresentar idades biológicas diferentes. Uma das principais estruturas biológicas envolvidas neste processo são os telómeros. Ao seu encurtamento contínuo durante a divisão celular é atribuída grande responsabilidade no processo de envelhecimento biológico.

O objetivo do presente estudo foi a caracterização do comprimento dos telómeros como potencial biomarcador de envelhecimento, de forma a permitir o estabelecimento de uma idade biológica. Assim, neste estudo o comprimento dos telómeros foi determinado pelo método de qPCR a partir de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, indivíduos diagnosticados com CaP ou com AVC, de forma a complementar a informação já existente da associação do comprimento dos telómeros com a idade biológica.

A associação entre a idade cronológica do grupo controlo e o comprimento dos seus telómeros não revelou diferenças estatisticamente significativas. A presença de variações interindividuais, como o género, os hábitos tabágicos ou o índice de massa corporal influenciam o comprimento dos telómeros e parecem influenciar o estabelecimento preciso de uma idade cronológica. Porém, a aplicação do estudo do comprimento dos telómeros no estabelecimento da idade biológica dos indivíduos revelou ser de extrema utilidade, verificando-se que os indivíduos afetados por patologias como CaP ou AVC apresentam variações de comprimento em relação aos indivíduos saudáveis. Estas variações permitem-nos concluir que os telómeros são parte integrante dos mecanismos de envelhecimento molecular das células do nosso organismo e podem ser utilizados como biomarcadores deste processo.



**ABSTRACT**





**ABSTRACT**

The establishment of the age of individuals is crucial to Forensic Medicine and Forensic Sciences, since it contributes to the process of identification of individuals. The aging of the human population is a complex process that occurs gradually, differing from individual to individual. The most common indicator in the evaluation of the aging process is the chronological age, which indicates the lifetime that the individual has been counting from his or her birth. However, the determination of chronological age may not be enough in the many areas of Legal Medicine. Thus, the determination of biological age may be a useful complement to chronological age, since individuals of the same age may have different levels of dysfunctions and vulnerabilities as they age and therefore have different biological ages. One of the major biological structures involved in this process are telomeres. Its continuous shortening during cell division is one of the main factors responsible for the biological aging process.

The aim of the present study was to characterize the telomere length as a potential aging biomarker, in order to allow the establishment of a biological age. Thus, in this study, telomere length was determined by the qPCR method from peripheral blood samples from healthy individuals, individuals diagnosed with CaP or with stroke, in order to complement the existing information on the association of telomere size with biological age.

The association between the chronological age of the control group and the length of their telomeres did not reveal any statistically significant difference. The presence of interindividual variations such as gender, smoking habits or body mass index seems to influence telomere length and consequently seem to influence the accurate prediction of a chronological age. However, the application of the study of telomere length in the establishment of the biological age of individuals revealed to be extremely useful, and it was verified that individuals affected by pathologies such as CaP or stroke presented length variations when compared to healthy individuals. These variations allow us to conclude that telomeres are an integral part of the molecular aging mechanisms of our cells and can be used as biomarkers of this process.



# INTRODUÇÃO





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Envelhecimento: Idade Cronológica *versus* Idade Biológica

O envelhecimento é um processo biológico gradual e multifatorial caracterizado pela diminuição das funções fisiológicas a nível molecular, celular e tecidual. O envelhecimento que se verifica na população mundial é descrito como sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças crónicas, tais como o cancro, a diabetes, as doenças neurodegenerativas e as doenças cardiovasculares, estando estas frequentemente associadas a uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade com o aumento da idade (1) (2).

O processo de envelhecimento é variável entre os diferentes indivíduos contribuindo para isso tanto fatores genéticos, inerentes ao próprio indivíduo, como fatores não genéticos, resultantes da exposição a fatores ambientais externos. Estima-se que 20 a 30% da variação na longevidade dos indivíduos se deve essencialmente a fatores genéticos, que influenciam a predisposição do indivíduo para o desenvolvimento de determinada doença, sendo considerados como fatores de risco (3). Estudos desenvolvidos neste âmbito revelam a existência de polimorfismos genéticos (alterações na sequência do DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – cuja variante menos frequente está presente em pelo menos 1% da população) capazes de influenciar processos biológicos fundamentais relacionados com o envelhecimento. Exemplos destes processos biológicos são a resposta a estímulos, a degradação proteica e a apoptose, que podem explicar diferenças de 8 anos ou mais no tempo de vida dos portadores dos denominados alelos de risco (3) (4). Entre os fatores não genéticos que influenciam o envelhecimento estão essencialmente fatores inerentes ao estilo de vida, como os hábitos alimentares e tabágicos, o stress fisiológico crónico, patologias prévias, obesidade e a inatividade física (5) (6).

As diferenças no processo de envelhecimento explicam a necessidade de distinguir dois conceitos: a idade cronológica e a idade biológica. A idade cronológica indica o tempo de vida que o indivíduo possui contado a partir do seu nascimento. Por sua vez, a idade biológica reflete um conjunto de processos multicausais e multisistémicos, independentes da idade cronológica, que reduzem a viabilidade do organismo e aumentam a sua vulnerabilidade (7).

Além dos sinais habituais de envelhecimento no ser humano como o aparecimento de cabelo grisalho, das rugas, das manchas na pele, da perda de massa muscular e adiposidade alterada, também a nível molecular se verificam alterações nos órgãos, tecidos e células que aumentam a suscetibilidade do indivíduo para desenvolver doenças nas últimas décadas de vida. A avaliação da deterioração dessas funções biológicas pode ser utilizada para prever o risco de sofrer de patologias relacionadas com a idade e estimar o tempo de vida útil dos indivíduos, tendo em consideração a heterogeneidade do envelhecimento celular de cada um (7) (8) (9).

Assim sendo, sabe-se que a idade biológica pode ocorrer a diferentes taxas para diferentes indivíduos, em contraste com a idade cronológica que aumenta na mesma taxa para todos os indivíduos e que por isso não reflete com precisão o estado funcional e de saúde de um indivíduo (10) (11) (12).

Um bom exemplo da variabilidade que ocorre entre a idade biológica e cronológica é o caso dos indivíduos que sofrem acidentes vasculares cerebrais (AVC's). Sabe-se que esta ocorrência está associada à idade e afeta maioritariamente a população mais idosa, estando os AVC's associados a uma prevalência de fatores de risco cardiovasculares padrão, tais como a hipertensão, a diabetes *mellitus*, a obesidade, os distúrbios lipídicos, as cardiopatias congénitas e o tabagismo (13). Porém, nos últimos anos, a incidência desta patologia tem aumentado em indivíduos mais jovens com idades inferiores a 50 anos, devido a interações atípicas entre fatores ambientais, vasculares, sistémicos, genéticos e do sistema nervoso central, apontando assim uma diferença entre a idade cronológica e biológica nestes indivíduos. Segundo o estudo de Soriano-Tárraga e colaboradores, verificou-se que a idade biológica dos indivíduos que sofreram um AVC em idades jovens é 2,5 anos superior à dos indivíduos saudáveis (13).

Na área das ciências forenses, a estimativa da idade é uma característica imprescindível na construção do perfil biológico de um indivíduo. Os avanços que ocorreram na análise de DNA permitem que atualmente se obtenham perfis genéticos únicos extraídos de evidências biológicas, tais como sangue, sêmen, saliva e células epiteliais (14) (15). Estes perfis têm possibilitado a resposta eficaz a questões relacionadas com a identificação humana, componente de grande importância nas solicitações periciais em Medicina Legal. No entanto, o estudo destes perfis não fornece qualquer indicação de idade do indivíduo.

A determinação da identificação médico-legal pode ser solicitada quer em indivíduos vivos, estando nestes casos associada a desaparecimentos, investigações de filiação e a portadores de documentos de identificação falsos ou sem qualquer tipo de prova legal da sua identidade, quer em restos cadavéricos/esqueletizados quando associados a incidentes como ataques terroristas, acidentes aéreos e rodoviários, incêndios, assassinatos em massa e desastres naturais como tsunamis, terremotos e inundações (15) (16).

Uma estimativa da idade é deste modo crucial no processo de identificação de um desconhecido, uma vez que permite a redução do número de suspeitos ou intervenientes num cenário de crime. Para além disso, existe uma necessidade crescente em estabelecer a idade dos indivíduos para que lhes sejam reconhecidos direitos civis, benefícios sociais, ou ainda eventuais penalizações e obrigações inerentes à sua idade, que podem estar associadas a questões de imputabilidade (17). Uma problemática crescente no nosso país referenciada pelo Serviço de Estrangeiros e Fronteiras (SEF) diz respeito ao afluxo de adultos que chegam acompanhados por menores sem apresentarem documentos de identidade e/ou documentos que comprovem o vínculo familiar ou a autorização dos progenitores para viajarem com a criança, revelando fortes indícios de tráfico de menores, uma vez que estas crianças normalmente estão indocumentadas ou apresentam documentos falsificados. É necessário averiguar a sua identidade e determinar a idade destas crianças ou jovens, de forma a encaminhá-las para centros de acolhimento apropriados.

Sendo assim, é essencial definir estratégias e metodologias sensíveis de modo a estimar a idade dos indivíduos. Podendo-se para isso recorrer a características físicas como elementos identificativos, através de técnicas de odontologia forense, que se baseiam nas características dentárias únicas de cada indivíduo, como a morfologia, variações na forma e tamanho, restaurações, patologias, falta de dentes, padrões de desgaste, cor e posição dos dentes, rotações e outras anomalias dentárias peculiares (16).

Especificamente para a estimativa da idade dentária examina-se a mineralização e maturação dentária, tendo em conta o número e a sequência das erupções dentárias e os estadios de mudanças regressivas nas coroas e raízes das peças dentárias. No entanto, estes métodos apresentam menos precisão com o aumento da idade do indivíduo em estudo. Em crianças e adolescentes pode-se estimar uma idade

cronológica com um intervalo de erro menor pois as variações da formação e maturação dentária estão bem estudadas e individualizadas em intervalos de tempo esperados para o seu desenvolvimento (16). No entanto, quando se pretende estimar a idade de um adulto com base na arcada dentária, e como é expectável que todos os indivíduos com mais de 30 anos já tenham completado a mineralização dentária, têm que se utilizar métodos com base nas alterações degenerativas das peças dentárias, o que está associado a intervalos de erro superiores, pois estas alterações estão dependentes de fatores de comportamento individuais e suscetibilidades relativas a modificações devido a fatores externos, como malnutrição, doenças hormonais e estilo de vida a que o indivíduo está sujeito (18). Uma problemática que se coloca na utilização do perfil dentário para identificação e estimativa de idade de um indivíduo é a falta de registos dentários anteriores, comprometendo assim a aplicação deste método pela carência de referências para comparação de dados, assim como a limitada precisão com o aumento da idade cronológica.

Também a antropologia forense pode auxiliar o processo de identificação, aplicando métodos de estimativa da idade esquelética que têm por base o crescimento e os processos de maturação dos ossos. Esta análise recai na observação de centros de ossificação e fusão, no tamanho dos ossos longos, nos estádios de união epifisal, suturas ósseas, perda óssea e alterações articulares. Contudo, a estimativa da idade cronológica através deste método tem sempre um risco de erro associado. Quanto mais velho for o indivíduo, mais difícil será determinar a sua idade, pois quando se atinge a maturidade/idade adulta, os indicadores de estimativa da idade passam a estar relacionados com processos degenerativos e de remodelação óssea que apresentam uma elevada variabilidade, dependendo essencialmente de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e patologias (19) (20).

Tendo em conta que o processo de envelhecimento está relacionado não só com a idade cronológica, mas também com a idade biológica dos indivíduos é fundamental complementar os métodos de estimativa de idade já existentes para dessa forma ultrapassar as limitações que se verificam com a aplicação dos mesmos. Assim é importante utilizar métodos que demonstrem os mecanismos moleculares subjacentes ao envelhecimento biológico do organismo.

## 1.2 Marcadores moleculares e o envelhecimento

Tal como já foi referido o envelhecimento é um processo multifatorial que em primeira instância se revela a nível molecular, envolvendo o acumular a longo prazo de danos no DNA e a decomposição de tecidos e órgãos. Detetando precocemente as alterações moleculares subjacentes a estes processos, através de biomarcadores moleculares e genéticos, podem definir-se grupos de risco para o desenvolvimento de doenças e desse modo promover uma intervenção terapêutica precoce e mais efetiva (8) (21).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), um biomarcador é um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas a uma exposição ou intervenção terapêutica (22). No mesmo sentido, também a Organização Mundial de Saúde (OMS) define biomarcador como uma medida que reflete a interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico. Existem três classes de biomarcadores: de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição podem ser quer substâncias exógenas que se medem no corpo humano, quer os seus metabolitos ou ainda o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e uma molécula ou célula alvo. Deles são exemplo a medição de cocaína e seus metabolitos no sangue ou urina para detetar o consumo de drogas de abuso. Os biomarcadores de efeito são agentes bioquímicos mensuráveis, fisiológicos, alterações comportamentais ou outra alteração dentro do organismo que podem ser associados a alterações do estado de saúde ou possíveis doenças. Deles são exemplo a medição da carboxiemoglobina que reflete a dose interna de monóxido de carbono que se liga a um tecido alvo. Por último, os biomarcadores de suscetibilidade analisam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição a uma substância xenobiótica específica. Deles são exemplo a deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (23).

Tendo em conta que indivíduos da mesma idade cronológica não envelhecem todos na mesma proporção, há necessidade de se entenderem os processos de envelhecimento biológico do organismo. Para tal, utilizam-se biomarcadores de envelhecimento: parâmetros biológicos quantificáveis que permitem identificar indivíduos em condições de risco para doenças relacionadas com a idade. Estes biomarcadores conseguem prever o declínio funcional, morbilidade e mortalidade de um indivíduo, fornecendo assim mais informações do que a idade cronológica (10) (24).

A maioria destes biomarcadores incluem a análise de alterações no DNA, RNA (*Ribonucleic Acid*), proteínas e fluidos corporais, representativos de sistemas e órgãos, como por exemplo a idade vascular, idade da pele, idade dentária, idade esquelética e idade cognitiva, que conjugadas entre si podem facilitar a diferenciação de indivíduos da mesma idade cronológica com taxas variantes de envelhecimento (8) (11) (25).

Os biomarcadores de envelhecimento biológico podem ser divididos em dois tipos: biomarcadores moleculares, baseados no estudo de ácidos nucleicos, e biomarcadores fenotípicos, tais como a pressão arterial, índice de massa corporal, níveis de glicose, insulina, triglicerídeos, creatinina e proteína C reativa. Estes marcadores fenotípicos são de fácil obtenção e análise dando uma visão geral da saúde do indivíduo, porém apresentam limitações na sua aplicação, uma vez que são influenciáveis por fatores ambientais e não podem ser utilizados como único elemento de análise para o cálculo da idade biológica, pois não refletem diretamente os mecanismos moleculares subjacentes ao processo de envelhecimento (26).

De acordo com a *American Federation of Aging Research* (AFAR) os preditores da idade biológica têm de preencher alguns critérios para a sua aplicação, tais como:

- 1 - Devem prever a taxa de envelhecimento, ou seja, refletir o tempo de vida útil do indivíduo melhor do que a idade cronológica;
- 2 - Devem monitorizar um processo básico subjacente ao processo de envelhecimento e não os efeitos de uma doença;
- 3 - Devem ser procedimentos que possam ser testados repetidamente sem prejudicar a pessoa;
- 4 - Devem possibilitar a sua manipulação em animais de laboratório (7) (10) (25).

Difícilmente existe um biomarcador que cumpra criteriosamente todos os pontos propostos pela AFAR, porém os que se destacam e assumem uma maior importância no estudo da idade biológica são o encurtamento do tamanho dos telómeros e a metilação do DNA, uma vez que estão intimamente relacionados com a expressão genética, estabilidade cromossômica e vulnerabilidade ao desenvolvimento de doença, contribuindo assim para a compreensão do mecanismo molecular e genético subjacente ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas (25) (27).

A medição do comprimento dos telômeros em leucócitos tem sido amplamente estudada pelos investigadores, uma vez que as evidências demonstram que à medida que os indivíduos envelhecem, o comprimento médio dos telômeros diminui (28) (29). O declínio do seu comprimento ao longo da vida do indivíduo permite prever uma idade biológica para o indivíduo, assim como as modificações epigenéticas baseadas no estudo de padrões de metilação do DNA através da análise de locais de metilação CpG localizados em genes específicos (30).

Contudo, podem utilizar-se outros métodos moleculares para estimar a idade humana, nomeadamente a análise de deleções do DNA, análise de perfis transcriptômicos, análise de microRNAs, bem como a análise da racemização do ácido aspártico e de produtos finais de glicosilação avançada (PGAs). No entanto estes métodos têm precisões relativamente baixas e algumas limitações práticas na sua aplicabilidade pela complexidade das metodologias utilizadas para deteção e pelo reduzido número de estudos efetuados acerca dos mesmos (25) (26).

Diversos estudos já foram elaborados com o objetivo de investigar as diferenças de idade biológica dos indivíduos, porém ainda não se encontrou um biomarcador que represente na totalidade a taxa de envelhecimento (11) (12) (25) (26) (31). É importante referir que os marcadores de envelhecimento biológico podem mudar ao longo da vida e que um único biomarcador pode não ser suficiente para refletir o envelhecimento em todos os sistemas biológicos. Sendo assim, torna-se necessário utilizar diferentes painéis de biomarcadores em diferentes idades, pois sabe-se que existe uma dinâmica associada dependente de fatores genéticos, ambientais ou do estilo de vida, que podem variar ao longo da vida do indivíduo (27).

Deste modo, é relevante a identificação de biomarcadores adicionais que forneçam informações precisas acerca do estado de saúde do indivíduo, pois possibilitaria a definição de *guidelines* para um envelhecimento saudável, auxiliando tanto na previsão como na prevenção de doenças, potenciando a longevidade dos indivíduos e uma melhoria da qualidade de vida. A medição do comprimento dos telômeros é um biomarcador com grande potencialidade nesta área sendo, desse modo alvo de inúmeras investigações.

### 1.3 Biologia dos Telômeros

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas localizadas nas extremidades dos cromossomas eucarióticos, compostos por uma sequência hexamérica repetitiva (TTAGGG). Estas estruturas apresentam múltiplas funções biológicas essenciais à sobrevivência das células, tais como a manutenção da estabilidade da estrutura cromossômica, protegendo assim o DNA cromossômico da degradação, perda e fusão das extremidades e recombinação atípica. Para além disso contribuem para o emparelhamento de cromossomas homólogos (28) (32).

Quando um indivíduo nasce, os seus telômeros têm um comprimento de aproximadamente 5 a 20 kb (kilobases) nas células somáticas. No entanto, após cada divisão mitótica, estes são progressivamente encurtados. Estudos apontam que a taxa anual do seu encurtamento em tecidos e órgãos humanos está compreendida entre os 50 a 120 pb (pares de bases) (32) (33).

O comprimento dos telômeros encurta gradualmente com o número de divisões celulares devido ao designado “problema de replicação final”. Este ocorre porque existe uma incapacidade intrínseca das DNA polimerases para sintetizar completamente a cadeia filha nas extremidades cromossômicas, resultando na perda de repetições dos telômeros (34) (35).

Os telômeros são estabilizados por um complexo de seis proteínas, designado por *shelterin*. Este complexo inclui os *Telomere Repeat Binding Factor 1 e 2* (TRF1 e TRF2), *Protection of Telomeres 1* (POT1), *TRF1- interacting nuclear protein 2* (TIN2), *Repressor Activator Protein 1* (RAP1) e *Tripeptidyl Peptidase 1* (TPP1) (28) (36). Para além disso, a manutenção da sua estabilidade depende da *Telomere Terminal Transferase*, também designada por telomerase, uma enzima que tem como função adicionar novas sequências de TTAGGG às extremidades dos cromossomas. A telomerase é constituída por um complexo de três ribonucleoproteínas: *Telomerase Reverse Transcriptase* (TERT), *Telomerase RNA Component* (TERC) e a *Telomerase Associated Protein 1* (TEP1). As proteínas TEP1 e TERC são sempre expressas, tornando a atividade enzimática da telomerase dependente da transcrição da TERT (37).

Para além desta enzima existem outras vias de manutenção do comprimento dos telômeros, baseadas na recombinação de DNA, designadas por *Alternative Lengthening*

of *Telomeres* (ALT). Desta forma, o comprimento dos telômeros resulta do balanço entre a erosão produzida durante a divisão celular, o alongamento conduzido pela telomerase e os processos baseados na recombinação (38).

Durante a proliferação de células germinativas os níveis de atividade da telomerase são muito elevados. Embora esta atividade se encontre diminuída nos espermatozoides e óvulos, quando ocorre a fertilização atinge-se outra vez um nível superior de atividade que se irá manter nas células embrionárias e germinativas transmitidas à próxima geração. Após o nascimento, a maioria das células somáticas humanas adultas expressam níveis insuficientes ou indetetáveis de telomerase, resultado da repressão da expressão do gene *TERT* na maioria dos tecidos a partir dos 3 a 4 meses de gestação, processo este que permite a eliminação de células por apoptose por terem atingido um nível crítico de encurtamento telomérico. A reativação da atividade da telomerase e o aumento da sua expressão estão associados ao desenvolvimento de tumores e são em parte responsáveis por conferir às células malignas uma capacidade de se autorrenovarem e de se proliferarem indefinidamente (Figura 1) (39).

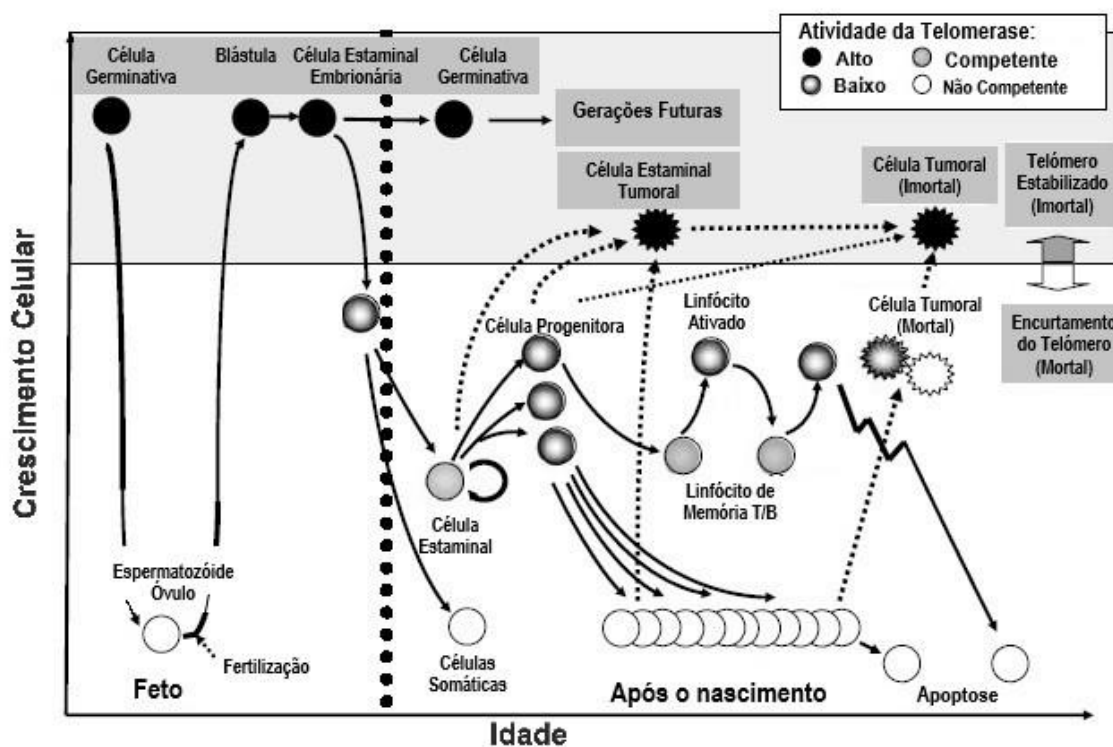


Figura 1 – Representação da atividade da telomerase ao longo da vida (adaptado de Hiyama e colaboradores (39)).

De facto, a telomerase é detetada em aproximadamente 85 a 90% de todos os tumores malignos (28). Têm sido propostos diversos mecanismos que promovem a sua atividade, entre os quais mutações/deleções no promotor *TERT*, envolvimento de *splicing* alternativo do *TERT*, amplificação do gene *TERT*, alterações epigenéticas ou mesmo a sua autorregulação. Estudos anteriores revelaram que em cancros avançados, é suficiente um nível de até 1% de telomerase ativa para manter os telómeros mais curtos e a sua expressão, mesmo que a curto prazo, em células normais é suficiente para duplicar a vida proliferativa das células (40).

Deste modo, tem surgido interesse por parte da comunidade científica no que concerne à inibição da expressão da telomerase como alvo importante na terapêutica de cancro. As diversas abordagens terapêuticas em investigação baseiam-se na inativação seletiva da expressão da telomerase nas células tumorais, uma vez que estas possuem uma elevada atividade, ao invés das células somáticas normais em que o nível de atividade da telomerase é reduzido ou mesmo inexistente (41).

#### **1.4 Comprimento dos telómeros como biomarcador molecular de envelhecimento**

Os telómeros apresentam propriedades fundamentais que os colocam no foco para estudos de envelhecimento, pois encurtam a cada divisão celular devido à replicação incompleta das suas extremidades, encurtam por dano oxidativo e quando atingem um comprimento considerado crítico, as células entram num estado senescente e a divisão celular termina. Devido a estas características são considerados o “relógio molecular” das células, pois definem o número de divisões celulares e o tempo de vida da célula (42).

O encurtamento progressivo dos telómeros num indivíduo saudável é um dos processos responsáveis pela perda progressiva e irreversível da capacidade replicativa das células somáticas. Este processo é um dos fatores que influenciam o envelhecimento de um indivíduo e foi descrito pela primeira vez por Hayflick e Moorhead quando introduziram o termo senescência celular (32) (34).

A senescência dependente do comprimento dos telómeros, também conhecida como senescência replicativa, é o principal modo de entrada no estado senescente em

vários tipos de células humanas, incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e células uroteliais (7). Este processo desencadeia-se quando o fragmento de restrição terminal telomérico atinge um comprimento médio de 4 a 7 kb. Nesse limiar crítico, o complexo protetor *shelterin* é interrompido, expondo uma extremidade do cromossoma de cadeia dupla que fica descoberta. Por sua vez é desencadeada uma resposta ao dano de DNA, impedindo que ocorra a progressão para a fase S do ciclo celular (43). Na ausência de um mecanismo normal de senescência, não ocorre apoptose, as células com defeitos genéticos proliferam e conseqüentemente surge instabilidade e anomalias cromossômicas que podem contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias associadas ao envelhecimento (Figura 2) (1) (35).

A redução do comprimento dos telômeros encontra-se associada a fatores de risco que incluem o tabagismo, a diabetes, a hipertensão, a hipercolesterolemia, a obesidade, a inatividade física, o consumo de álcool e questões psicológicas (5) (7) (28) (37) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50).

Diversos estudos têm documentado a correlação entre essa diminuição e diversas doenças associadas à idade, desde doenças cardiovasculares, aterosclerose, Alzheimer, AVC's e cancro (Figura 2) (1) (33) (37) (51) (52).

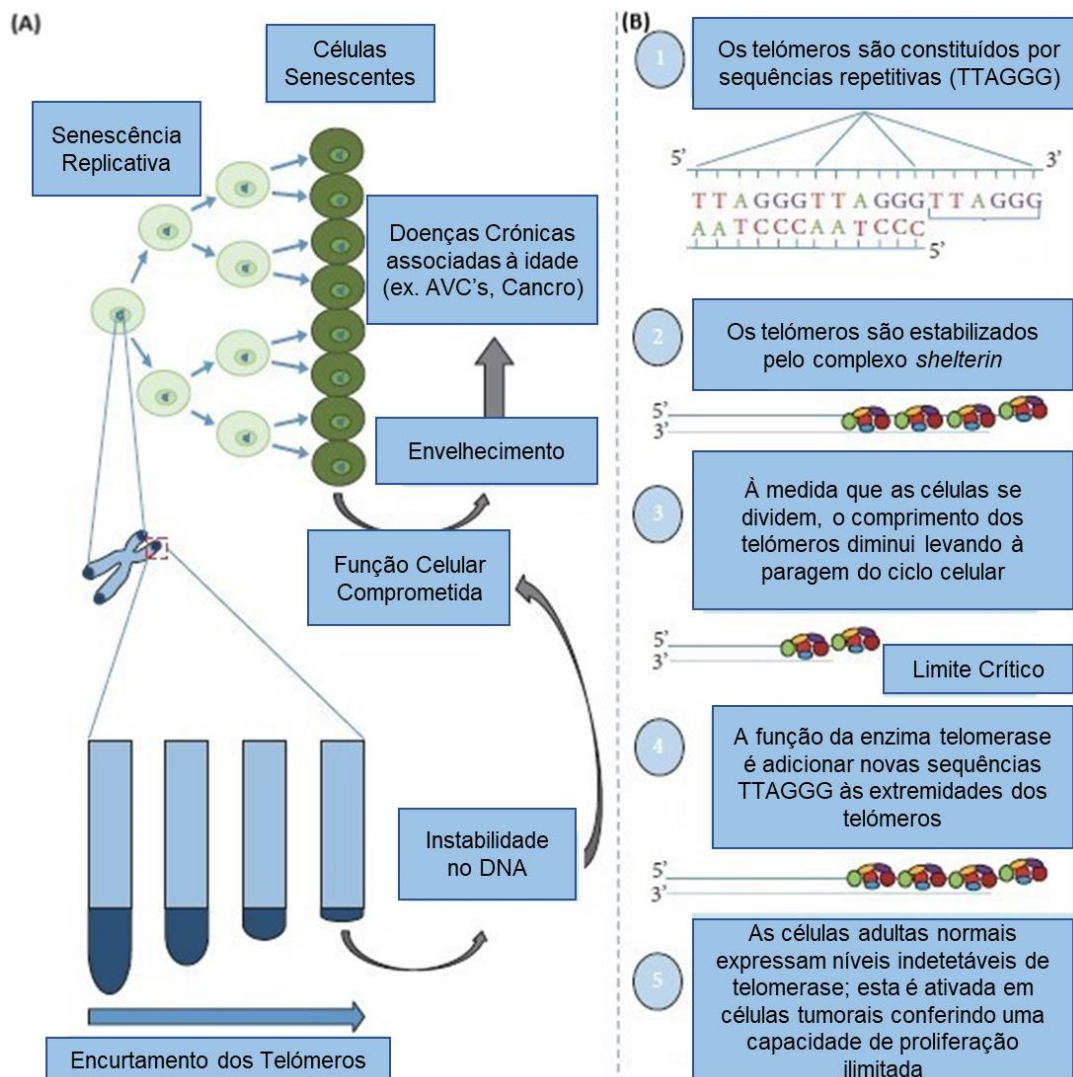


Figura 2 – Representação esquemática dos processos (A) de senescência celular, consequente diminuição do tamanho dos telômeros e risco de desenvolvimento de doenças, e (B) da biologia do telômero e da manutenção do seu comprimento (adaptado de Almeida e colaboradores (1)).

### 1.5 Medição do comprimento dos telômeros

O comprimento telomérico é frequentemente estudado em leucócitos do sangue periférico a partir de uma simples colheita de sangue periférico, que permite a obtenção de grandes quantidades de DNA de alta qualidade. Porém, quando não é possível obter uma amostra de sangue periférico existem outros métodos de colheita, como a colheita de manchas de sangue seco e amostras de saliva. Vários investigadores provaram que existe uma correlação entre o comprimento dos telômeros de amostras de sangue

periférico e outros tecidos, o que permite assumir que é um marcador válido para estimar o comprimento dos telómeros noutros tecidos (53).

A utilidade da medição do comprimento dos telómeros depende da validade, precisão e confiabilidade da técnica de medição utilizada para a sua análise. A técnica original considerada como a técnica *Gold Standard* é a análise do *Terminal Restriction Fragment* (TRF). Neste procedimento, o DNA genómico é digerido utilizando uma mistura de enzimas de restrição. Os fragmentos teloméricos são posteriormente visualizados por *Southern Blot* utilizando uma sonda específica para o DNA telomérico e os seus comprimentos medidos através de eletroforese em gel de agarose por comparação com um marcador de peso molecular de DNA (36) (54).

Apesar do método de *Southern Blot* ser útil, a sua execução é muito laboriosa e a interpretação depende da experiência do operador. Assim, em estudos mais recentes os investigadores têm utilizado uma técnica mais rápida e eficiente para determinar o comprimento dos telómeros: o *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) (14). Em 2002, Cawthon e colaboradores desenvolveram um método com base no qPCR que determina a diferença entre uma amostra de DNA e uma amostra de DNA de referência. Mede-se o número de repetições do telómero (T) e o número de cópias de um gene de cópia única conhecida (S). A razão entre T e S é diretamente proporcional ao comprimento médio de telómeros por célula (55). Em 2009, o próprio Cawthon fez uma modificação ao protocolo que previamente estabeleceu, introduzindo um oligómero padrão para gerar valores absolutos (aTL - *absolute telomere length*) (6) (56).

Outro método que se pode utilizar na medição de telómeros é o método STELA (*Single Telomere Length Analysis*), uma abordagem baseada em PCR que mede o comprimento de telómeros, utilizando *primers* específicos para as sequências subtelo méricas de cromossomas individualizados. No entanto esta técnica não permite o reconhecimento de todos os telómeros criticamente curtos (36) (57) (58).

Outra técnica que nos permite medir o comprimento dos telómeros é a *Quantitative fluorescence in situ hybridization* (Q-FISH) através da avaliação de cromossomas metafásicos ou núcleos interfásicos após hibridização com uma sonda fluorescente. O substrato para esta técnica não é DNA, mas sim células que podem ser frescas, congeladas, ou ainda tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. A principal desvantagem da utilização desta técnica é a necessidade de células mitoticamente

ativas para medição dos telómeros, impossibilitando dessa forma a detecção em células terminais senescentes (36) (59).

Por fim, a flow-FISH é uma técnica que consiste numa adaptação da Q-FISH, combinando citometria de fluxo com a hibridização de uma sonda pantelomérica, ou seja, que se liga a todos os telómeros. Esta metodologia permite a quantificação média de fluorescência presente nas células, valor que é utilizado para fornecer um comprimento médio dos telómeros para a população de células a avaliar. Este método também fornece um meio para inferir a distribuição tridimensional dos sinais teloméricos dentro das células. Aplica-se principalmente em amostras de sangue fresco e fornece apenas um valor médio da intensidade de telómeros (36) (58) (59).

Os diversos métodos de medição, cada um com as suas estratégias e abordagens apresentam simultaneamente vantagens e limitações, que estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Métodos de medição do comprimento dos telómeros e suas respectivas vantagens e desvantagens.

Método	Vantagens	Desvantagens	Referência
<b>TRF/ Southern blot hybridization</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica “<i>Gold Standard</i>”;</li> <li>- Não requer equipamento especializado;</li> <li>- Pode detetar uma única banda de sinal;</li> <li>- Numerosos estudos para comparação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requer uma elevada quantidade de amostra de DNA (&gt;1µg);</li> <li>- Trabalho laboratorial intenso;</li> <li>- Polimorfismos subtelo méricos podem interferir nos dados;</li> <li>- Produz uma medida média do comprimento telomérico, porém não deteta telómeros curtos.</li> </ul>	(36) (54)
<b>qPCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requer uma reduzida quantidade de amostra de DNA (ng);</li> <li>- Técnica laboratorial simples e rápida;</li> <li>- Medição da relação entre o nº de cópias repetidas dos telómeros e o nº de cópias do gene de cópia única.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Produz uma medida média do comprimento telomérico, porém não deteta telómeros curtos;</li> <li>- Necessária calibração exata.</li> </ul>	(6) (14) (55) (56)
<b>STELA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite detetar telómeros curtos;</li> <li>- Requer quantidades reduzidas de DNA (pg);</li> <li>- Não necessita de equipamento especializado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Informação restrita a extremidades cromossômicas bem caracterizadas: XpYp, 2p, 11q e 17p;</li> <li>- Não produz medidas médias do comprimento dos telómeros;</li> <li>- Capacidade limitada em detetar telómeros longos;</li> <li>- Trabalho laboratorial intenso.</li> </ul>	(36) (57) (58)
<b>Q-FISH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite identificar telómeros individuais curtos ou longos, extremidades sem sinal, telómeros de ponta a ponta e medidas médias do comprimento telomérico;</li> <li>- Permite a medição do comprimento telomérico em tipos específicos de células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requer equipamento técnico especializado e dispendioso;</li> <li>- Requer células mitoticamente ativas para cromossomas metafásicos;</li> <li>- Análise de poucas amostras ao mesmo tempo.</li> </ul>	(36) (59)
<b>Flow-FISH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite determinar a medida média de populações celulares específicas;</li> <li>- Caracterização de linhagens celulares;</li> <li>- Potencialidade de automação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trabalho laboratorial intenso;</li> <li>- Requer equipamento técnico especializado e dispendioso;</li> <li>- Medição restrita para suspensões de células isoladas.</li> </ul>	(36) (58) (59)

## 1.6 Patologias relacionadas com o encurtamento dos telómeros

O AVC é um problema de saúde global, sendo considerado uma das principais causas de morte em adultos em todo o mundo (47) (60) (61). O AVC caracteriza-se pela morte súbita de células cerebrais devido à falta de oxigénio quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é perdido devido ao bloqueio de uma artéria (acidente vascular cerebral isquémico), ou devido à rutura de um vaso sanguíneo (acidente vascular hemorrágico). O tipo mais comum de acidente vascular cerebral é o isquémico, responsável por 43,7% a 79,9% da totalidade dos AVC's (62).

Em Portugal o AVC atinge cerca de três pessoas por hora, resultando num total aproximado de 26 000 portugueses afetados por ano. Os indivíduos que conseguem sobreviver ficam frequentemente com incapacidades, necessitando de cuidados a longo prazo. Além disso, correm um maior risco de recorrência da doença (63).

A patogénese do AVC está na maioria das vezes relacionada com a formação e rutura de placas ateroscleróticas nos grandes vasos cerebrais. O processo aterosclerótico caracteriza-se pela deposição de lipoproteínas e migração de células inflamatórias, provocando uma redução progressiva do calibre arterial. Com base em estudos anteriores, foi proposto que o encurtamento dos telómeros no endotélio e, conseqüentemente, a senescência das células endoteliais contribuam para o processo aterosclerótico nas artérias coronárias (49) (60) (64) (65). Um estudo recente efetuado na população chinesa revelou uma associação positiva entre telómeros mais curtos e o risco de AVC isquémico, independente dos fatores de risco vasculares convencionais, como tabagismo, consumo de álcool, hipertensão e história clínica de diabetes (61). Porém, nem todos os estudos estão em conformidade com estes resultados, já que alguns não demonstram evidências de associação do comprimento relativo dos telómeros com o risco de incidência de AVC isquémico (66) (67).

Outra patologia que podemos associar ao comprimento dos telómeros e que motiva uma investigação constante é o cancro, uma vez que representa uma das doenças mais mortais no mundo. O Cancro da Próstata (CaP) é atualmente reconhecido como um dos principais problemas de saúde que afeta a população masculina, admitindo-se que 1 em cada 7 homens desenvolverá CaP. A sua prevalência está a aumentar gradualmente, sendo que este já é o segundo cancro mais frequente em homens nos países desenvolvidos. Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer*

(IARC) estima-se que 1,1 milhão de homens em todo o mundo tenham sido diagnosticados com CaP em 2012, o que corresponde a uma percentagem de 15% dos cancros diagnosticados em homens, com quase 70% dos casos (759 000) a ocorrerem em regiões mais desenvolvidas. Com uma estimativa de 307 000 mortes em 2012, o CaP é a quinta principal causa de morte por cancro em homens (6,6% do total de mortes) (68).

Em Portugal, segundo dados de 2010 a 2015 da Direção Geral de Saúde (DGS) a taxa de mortalidade e o número de óbitos relacionados com o CaP tiveram uma diminuição e ocorreram em idades mais avançadas (69). Isto deve-se sobretudo ao aumento da utilização do teste de doseamento do PSA (*Prostate specific antigen*) como uma ferramenta de rastreio de rotina, permitindo a deteção desta patologia em fases precoces. Contudo, este teste apresenta algumas limitações relacionadas com a sua reduzida especificidade que pode conduzir a um sobrediagnóstico e sobretratamento (70). Sendo assim, o teste de PSA deve ser aliado a outros métodos de diagnóstico e monitorização.

O CaP é caracterizado por uma proeminente instabilidade cromossómica e por esse motivo o encurtamento dos telómeros pode ser observado desde as lesões precursoras benignas do epitélio prostático até às neoplasias intraepiteliais prostáticas de alto grau (44). As evidências sugerem uma contribuição inflamatória que aumenta a produção local de ROS (*Reactive Oxygen Species*), o que acelera o encurtamento dos telómeros, além das perdas causadas pela proliferação celular (71).

Os telómeros têm sido um biomarcador muito utilizado em estudos para tentar perceber se a medição do seu comprimento pode ser um indicador de risco para o desenvolvimento de cancro. O seu encurtamento apresenta uma dupla função quando relacionado com patologias oncológicas. Por um lado, a perda progressiva de repetições teloméricas a cada ciclo de divisão celular induz a senescência replicativa, limitando assim o potencial proliferativo das células, tendo uma função de supressor tumoral. Por outro lado, quando os telómeros chegam a um limite crítico de encurtamento, gera-se instabilidade genómica que potencia o início e a progressão tumoral, tendo uma função carcinogénica (72).

Os telómeros são, portanto, parte integrante da iniciação e progressão do CaP e, desse modo, podem ser relevantes no diagnóstico desta doença, podendo a sua medição ser aplicada como uma medida adicional das ferramentas de diagnóstico já

existentes. Em casos de homens com o PSA sérico persistentemente elevado, mas com resultados negativos nas biópsias, se os telómeros apresentarem um comprimento anormalmente curto nas populações de células estromais ou epiteliais que estiverem presentes na biópsia, isso pode sugerir que efetivamente existe alguma anomalia, desencadeando uma repetição da biópsia.

O comprimento dos telómeros é assim, influenciado não só por diferentes hábitos de vida, mas também por doenças como o cancro ou os AVC's. Estando os telómeros estreitamente relacionados com diferenças na idade biológica de diferentes indivíduos, há necessidade de esclarecer a utilidade da medição do seu comprimento, de forma a possibilitar a sua aplicação como um biomarcador de envelhecimento potencialmente utilizável no contexto da Medicina Legal.

# OBJETIVOS





## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este estudo tem como objetivo principal a caracterização do comprimento dos telómeros como potencial biomarcador de envelhecimento, de forma a permitir o estabelecimento de uma idade biológica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterização do comprimento dos telómeros de indivíduos saudáveis e sua associação com a idade cronológica, género, hábitos tabágicos e índice de massa corporal com recurso a amostras de sangue periférico;
- Caracterização do comprimento dos telómeros de indivíduos com diagnóstico de CaP e de AVC.



# MATERIAL E MÉTODOS





### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 População em estudo

O estudo do comprimento dos telómeros como biomarcador de envelhecimento foi realizado com base num estudo que envolveu 408 indivíduos. Todas as amostras biológicas foram provenientes de indivíduos portugueses e foram utilizadas após o seu conhecimento e consentimento prévio, de acordo com a Declaração de Helsínquia.

Neste estudo foram incluídos 91 indivíduos saudáveis (Grupo Controlo) e sem evidência de doença neoplásica ou história clínica de AVC's, com uma média de idade de  $36 \pm 11,5$  anos, recrutados a partir do banco de dadores de sangue do IPO do Porto, sendo que 42,9% eram mulheres e 57,1% eram homens. Neste grupo de indivíduos saudáveis, 57,1% eram não fumadores, 27,5% fumadores e 15,4% ex-fumadores. Relativamente ao IMC (Índice de Massa Corporal), 31,9% dos indivíduos apresentavam um IMC saudável, 52,7% sobrepeso, 13,2% obesidade grau I e 2,2% obesidade grau II.

Simultaneamente, participaram também no presente estudo 193 homens com diagnóstico histopatológico de CaP (Grupo CaP), com uma média de idade de  $63,2 \pm 12,3$  anos, recrutados no IPO do Porto. Neste grupo de estudo, 51% apresentavam o estadio T1+T2, 29% estadio T3+T4 e 20% doença metastática (N+ e/ou M+). Relativamente aos hábitos tabágicos destes indivíduos, 53% eram não fumadores, 19,1% fumadores e 27,8% ex-fumadores. Neste grupo de indivíduos 38,2% apresentavam um IMC saudável, 50% sobrepeso e 11,8% obesidade grau I.

O último grupo englobado no estudo era formado por 124 indivíduos com diagnóstico de AVC (Grupo AVC), com uma média de idade de  $69,7 \pm 18,7$  anos, sendo que 44,4% eram mulheres e 55,6% eram homens, recrutados no Centro Hospitalar São João. Neste grupo de estudo, 30,6% apresentavam um diagnóstico de TACI (*Total Anterior Circulation Infarct*) e os restantes 69,4% apresentavam outros subtipos clínicos de AVC. Relativamente aos hábitos tabágicos destes indivíduos, 50% eram não fumadores, 30,6% fumadores e 19,4% ex-fumadores. Neste grupo de estudo 35,8% apresentavam um IMC saudável e 64,2% Sobrepeso/Obesidade.

A todos os participantes foi recolhida uma amostra de sangue venoso periférico (8 mL) através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa.

### 3.2 Extração de DNA Genómico

Para a extração de DNA das amostras em estudo utilizou-se o kit de extração *GRS Genomic DNA Kit – Blood & Cultured Cells*, de acordo com as recomendações do fabricante *GRiSP Research Solutions*.

Este método é rápido e eficiente, permitindo a purificação e/ou concentração de DNA total de elevada qualidade (no caso, DNA genómico) a partir de amostras de sangue venoso total (200µL). O procedimento de extração baseia-se na utilização de colunas revestidas por sílica, contendo uma resina com partículas de sais caotrópicos, que promovem a desnaturação das proteínas e a extração de DNA. O DNA que é purificado e eluído por este método é viável para a realização de PCR's e outras reações enzimáticas.

O procedimento de extração consiste na passagem por várias fases: uma fase de lise celular, em que se utilizam sais caotrópicos e enzimas (Proteinase K) para lisar as células e desnaturar as proteínas, de forma a libertar os ácidos nucleicos que estão localizados no núcleo das células; uma fase de adsorção, em que há a ligação seletiva do DNA à membrana de sílica; uma fase de lavagem, de modo a remover contaminantes residuais, tais como proteínas, catiões divalentes, nucleótidos não incorporados e enzimas, através de tampões de lavagem, que incluem etanol, pois este promove a remoção das impurezas não desejadas; e por fim, uma etapa de eluição, em que o DNA genómico purificado é libertado da membrana de sílica, através de um tampão de eluição com reduzida concentração de sais.

O DNA obtido é posteriormente armazenado a -20°C até à sua utilização.

Da totalidade dos casos estudados, selecionaram-se aleatoriamente 20% das amostras de cada grupo de estudo para quantificar e avaliar a pureza do DNA obtido. Esta medição foi feita no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®).

### 3.3 Quantificação relativa do comprimento dos telómeros por qPCR

Para a determinação dos valores do comprimento dos telómeros de todas as amostras em estudo foi utilizado o método de qPCR estabelecido por Cawthon, por ser um método rápido, preciso, eficiente, com bom rendimento e baixos custos (55).

O qPCR determina para cada amostra o número de ciclos no qual a fluorescência acumulada ultrapassa a sua baseline: o Ct (*Cycle threshold*). Para realizar estas quantificações recorremos ao equipamento de qPCR *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*®). Através da utilização do corante fluorescente *Xpert Fast SYBR* (*GRISP Research Solutions*®), que se liga a cada nova cópia de DNA formado ao longo dos ciclos de PCR, é possível acompanhar o aumento da intensidade da sua fluorescência, que será proporcional à quantidade de produto de PCR final formado.

Os *primers* utilizados para o PCR de telómeros foram o tel1b [5'-CGGTTT(GTTTGG)<sub>5</sub>GTT-3'], com a concentração final de 270 nM e o tel2b [5'-GGCTTG(CCTTAC)<sub>5</sub>CCT-3'], com a concentração final de 900 nM.

Os *primers* utilizados para o PCR de gene de cópia única/ gene endógeno HBB (Beta-Globina Humana) foram a HBB1 [5'- GCTTCTGACACA ACTGTGTTCACTAGC-3'] e a HBB2 [5'- CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3'], ambos com a concentração final de 500nM.

As condições de amplificação para o PCR de telómeros foram um ciclo de desnaturação a 95°C durante 20 segundos, seguida de 22 ciclos de desnaturação a 95°C durante 3 segundos, *annealing* a 54°C durante 30 segundos e desnaturação a 95°C durante 15 segundos. Por fim, um ciclo de extensão a 60°C durante 1 minuto. A temperatura da curva de *melting* foi de 82,75°C.

Para o gene de cópia única as condições de amplificação foram a desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e *annealing* a 58°C durante 1 minuto, passando por outra etapa de desnaturação a 95°C durante 15 segundos. Por fim, um ciclo de extensão a 60°C durante 1 minuto. A temperatura da curva de *melting* foi de 84,08°C.

Para determinação da eficiência das reações, em todas as medições efetuadas foram utilizados 3 *standards* com concentrações decrescentes de 0,2; 0,04 e 0,008, controlos negativos e todas as quantificações foram efetuadas em duplicado.

### 3.4 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do software IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> *Statistics for Windows* (Versão 25.0). O método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \leftrightarrow \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_x - \Delta Ct_y$ ), o teste *T* de Student e o teste U de Mann-Whitney foram utilizados para avaliar as diferenças estatísticas na expressão normalizada do comprimento dos telómeros analisados. O *odds ratio* e o intervalo de confiança a 95% foram calculados como medida de associação entre o comprimento dos telómeros no grupo controlo e nos grupos CaP e AVC.

## RESULTADOS





## 4. RESULTADOS

### 4.1 Qualidade da amostra de DNA e frequência de detecção do fragmento de interesse

Nas figuras 3 e 4 está representado graficamente, a quantidade e pureza de DNA das amostras em estudo e a percentagem de detecção nos diferentes grupos de indivíduos analisados, respetivamente.

Relativamente à pureza das amostras, verificou-se que os 3 grupos de indivíduos apresentam médias de valores próximos entre si (Grupo AVC 1,4; Grupo Controlo 1,5; Grupo CaP 1,7). No entanto, o mesmo não se verifica na quantificação de DNA, já que o grupo CaP evidencia uma maior quantidade (38,8 ng/μL), comparativamente ao observado no grupo AVC (11,6 ng/μL) e no grupo controlo (14,7 ng/μL) (Figura 3).

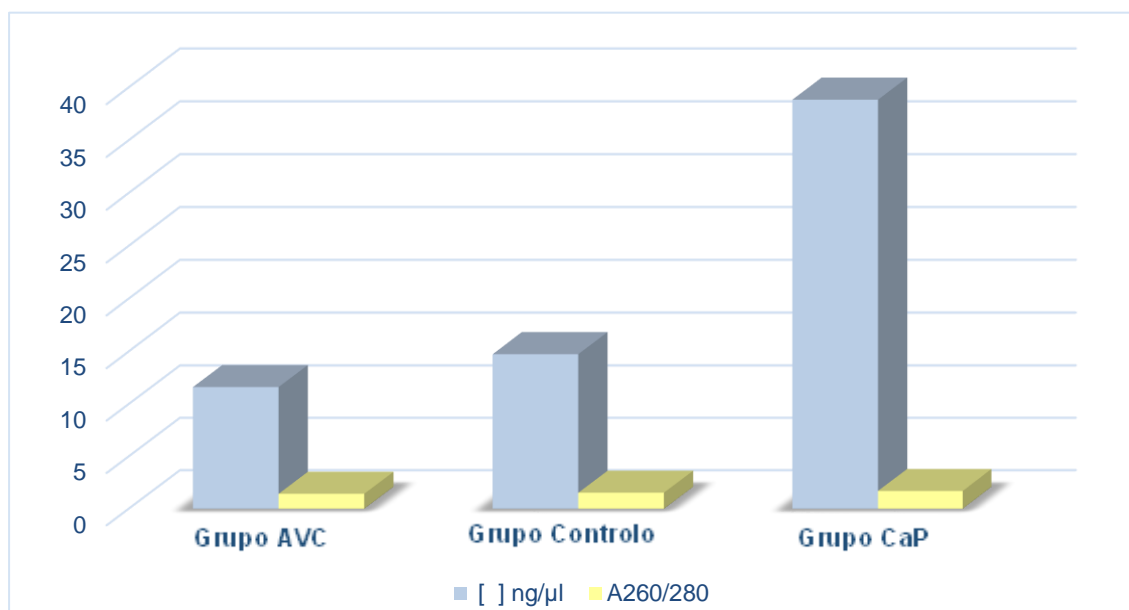


Figura 3 – Quantidade (ng/μL) e pureza de DNA das amostras em estudo nos diferentes grupos de indivíduos.

No que diz respeito à detecção do fragmento de DNA da região telomérica, no grupo AVC esta foi de 100%. O mesmo se verificou no grupo controlo. No entanto, no grupo CaP só foi possível amplificar esta região em 88,6% dos casos (Figura 4).

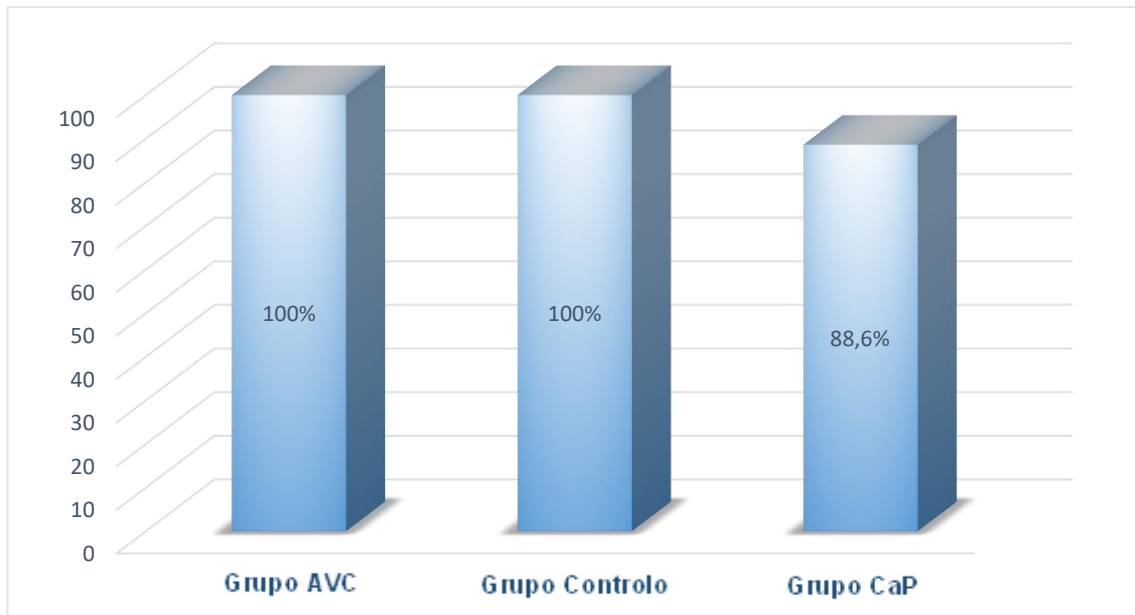


Figura 4 - Percentagem de detecção da região de DNA de interesse nos diferentes grupos de indivíduos em estudo.

#### 4.2 Análise do comprimento dos telômeros no Grupo Controle

Para o estudo da associação entre a idade cronológica do grupo controle e o comprimento dos telômeros, foram definidos 3 grupos etários:  $\leq 30$  anos; 31-50 anos e  $\geq 51$  anos, estando representado na figura 5 o comprimento dos telômeros do grupo controle segundo os grupos etários definidos. De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no comprimento dos telômeros ( $\leq 30$  anos *versus*  $\geq 51$  anos  $P = 0,078$ ;  $\leq 30$  anos *versus* 31-50 anos  $P = 0,111$ ) (Figura 5).

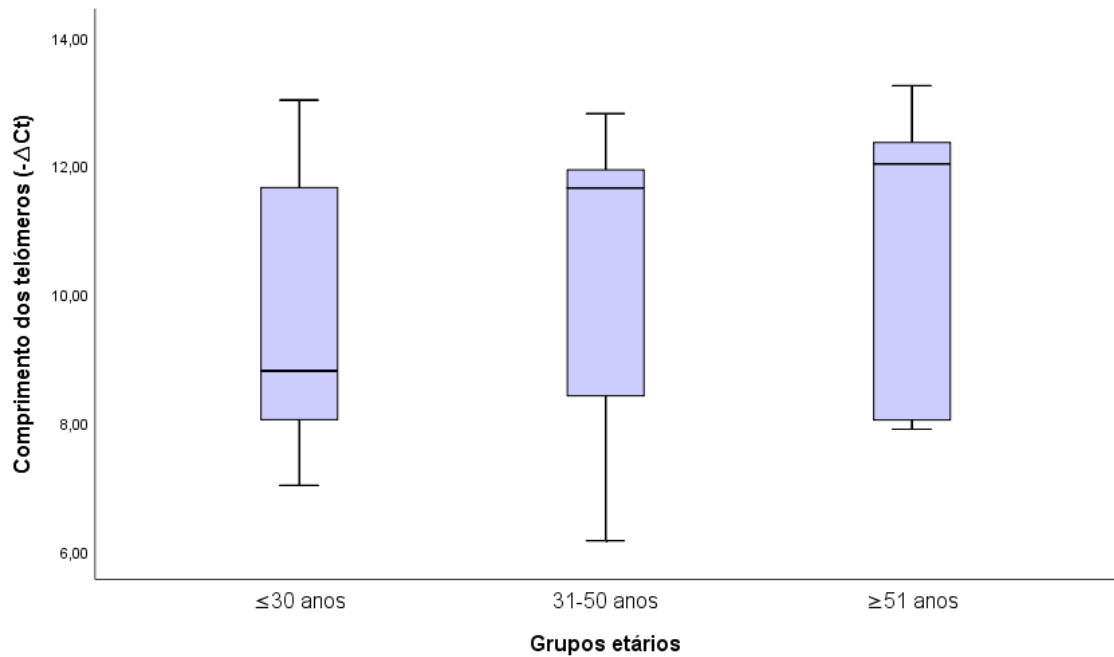


Figura 5 - Comprimento dos telômeros no grupo controlo segundo os grupos etários definidos (média  $\pm$  desvio padrão).

Estratificando o grupo controlo pelo género, verificamos na nossa população em estudo que as mulheres apresentam um maior comprimento dos telômeros comparativamente aos homens, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 15,3$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 6).

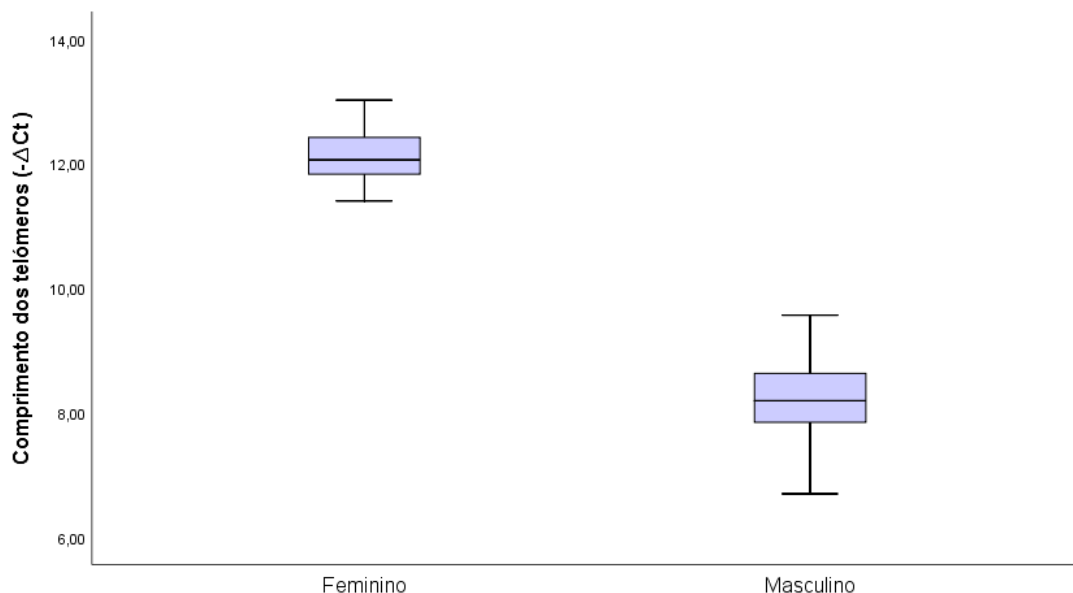


Figura 6 - Comprimento dos telômeros no grupo controlo de acordo com a variável género (média  $\pm$  desvio padrão).

Quando estratificamos a população do grupo controlo de acordo com os hábitos tabágicos, verificamos que os indivíduos fumadores com idade inferior a 36 anos apresentam um menor comprimento dos telómeros quando comparados com os indivíduos da mesma idade e não fumadores ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,4$ ;  $P = 0,008$ ). Contrariamente, não observamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos o comprimento dos telómeros nos indivíduos com idade inferior a 36 anos ex-fumadores *versus* não fumadores ( $P = 0,372$ ) (Figura 7).

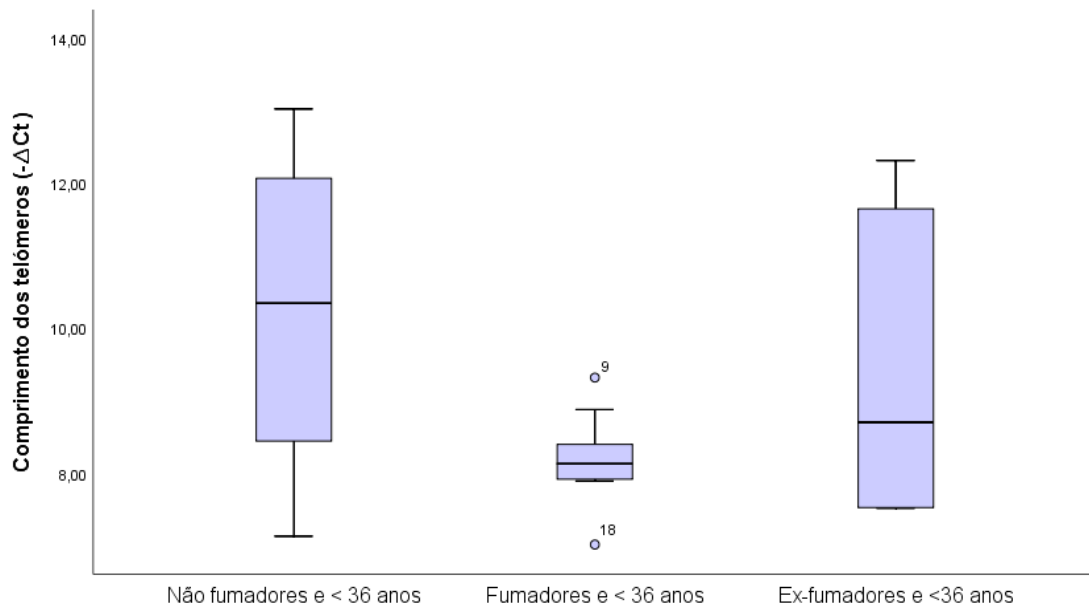


Figura 7 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo segundo a variável hábitos tabágicos em indivíduos com idade inferior a 36 anos (média  $\pm$  desvio padrão).

Nos indivíduos com idades superiores ou iguais a 36 anos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quer quando comparados o comprimento dos telómeros dos fumadores *versus* não fumadores ( $P = 0,088$ ), quer quando comparados o comprimento destes nos não fumadores *versus* ex-fumadores ( $P = 0,083$ ) (Figura 8).

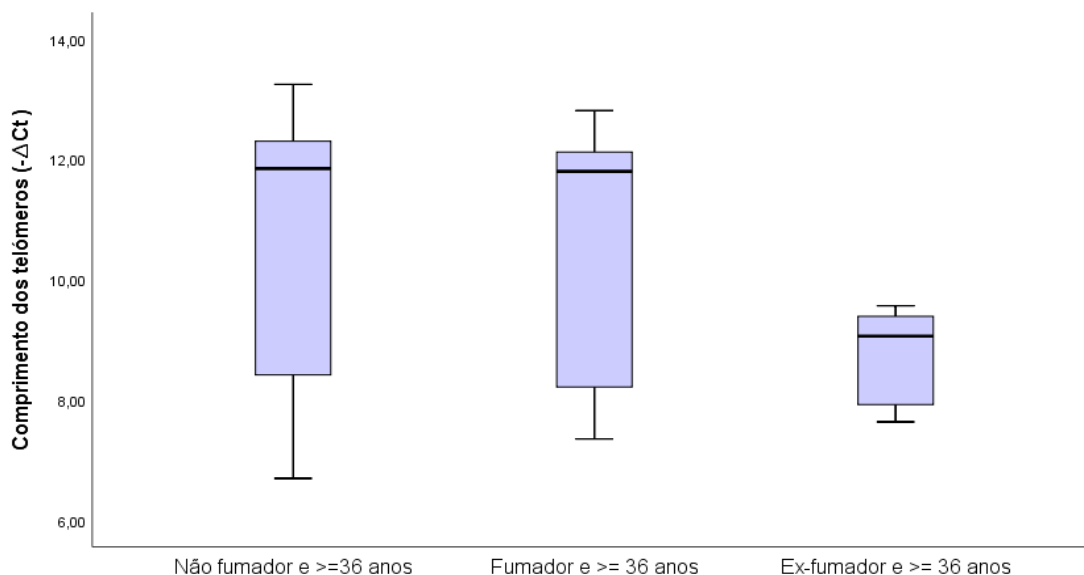


Figura 8 - Comprimento dos telómeros no grupo controlo segundo a variável hábitos tabágicos em indivíduos com idade superior ou igual a 36 anos (média  $\pm$  desvio padrão).

Relativamente ao IMC, verifica-se que 46,7% dos indivíduos com idade inferior a 36 anos apresentam um IMC saudável, contrariamente ao verificado no grupo de indivíduos com idade superior ou igual a 36 anos em que os IMC's de Sobrepeso, Obesidade Grau I e II correspondem a 82,6% da população e apenas 17,4% apresentam um IMC saudável.

### 4.3 Análise do comprimento dos telómeros no Grupo CaP

A análise do comprimento dos telómeros nos homens do grupo controlo revela que estes apresentam telómeros com comprimento superior comparativamente ao grupo de CaP ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,2$ ;  $P = 0,002$ ) (Figura 9).

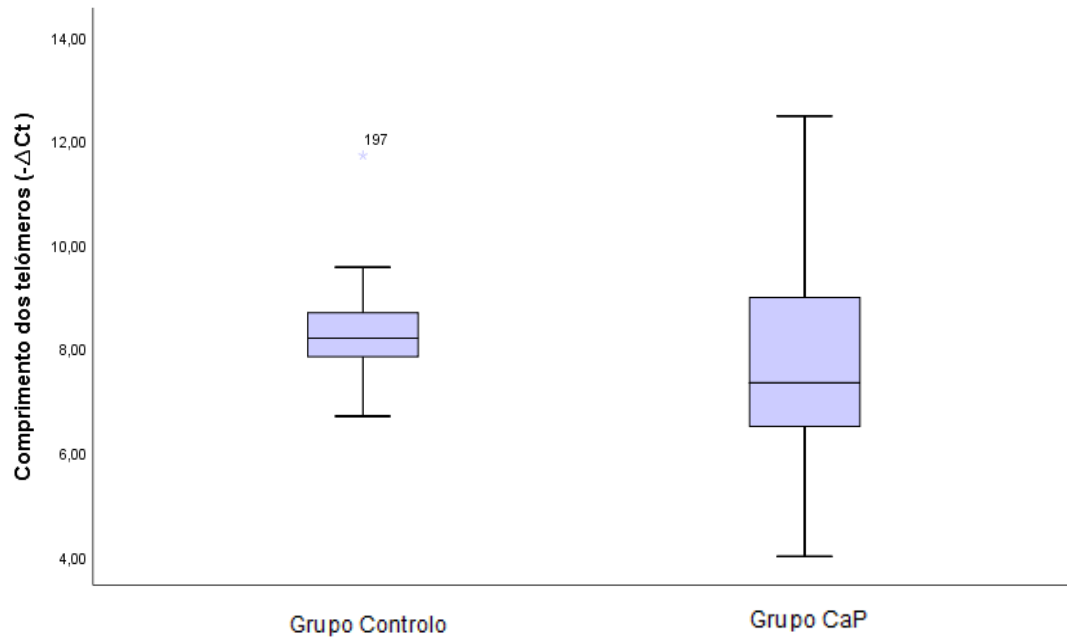


Figura 9 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controle *versus* grupo CaP (média  $\pm$  desvio padrão).

A população em estudo (grupo controle e grupo CaP) foi estratificada em duas categorias considerando o comprimento dos telómeros: comprimento longo e comprimento curto. Esta divisão foi realizada considerando o valor da mediana do  $\Delta Ct$ , sendo este de 7,6. Deste modo, verificamos que no grupo controle, a frequência de indivíduos que apresenta comprimentos longos é de 0,79 e comprimentos curtos é de 0,21. No que diz respeito ao grupo CaP a frequência de indivíduos com comprimentos longos é de 0,41 e comprimentos curtos é de 0,59 (Tabela 2). Observamos que, os indivíduos com telómeros mais curtos apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de CaP, comparativamente aos indivíduos com telómeros mais longos (OR=5,33; IC 95%: 2,56 -11,07;  $P < 0,001$ ) (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição das frequências de telômeros no grupo controlo e no grupo de CaP de acordo com o seu comprimento e análise de OR.

	Grupo Controlo n (frequência)	Grupo CaP n (frequência)	OR	IC 95%	P
<b>Comprimento longo</b>	41 (0,79)	70 (0,41)	1,00	Referência	
<b>Comprimento curto</b>	11 (0,21)	100 (0,59)	5,33	2,56 – 11,07	<0,001

OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo confiança a 95%; P: teste  $X^2$

Relativamente aos hábitos tabágicos não verificamos diferenças estatisticamente significativas no grupo CaP (fumadores *versus* ex-fumadores,  $P = 0,211$ ; fumadores *versus* não-fumadores,  $P = 0,430$ ) (Figura 10).

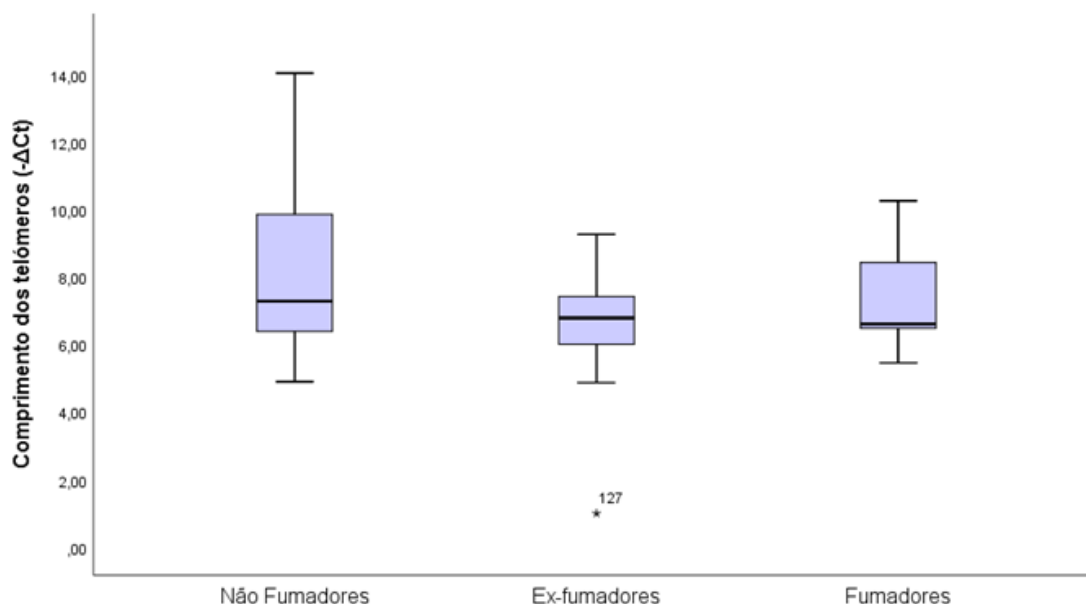


Figura 10 - Comparação do comprimento dos telômeros do grupo CaP segundo a variável hábitos tabágicos (média  $\pm$  desvio padrão).

Relativamente ao IMC, verifica-se que 38,2% do Grupo CaP apresenta um IMC saudável e 61,8% dos indivíduos apresenta IMC's de Sobrepeso, Obesidade Grau I e II. Nos homens do grupo controlo 28,8% apresenta IMC saudável e 71,2% apresenta IMC's de Sobrepeso, Obesidade Grau I e II.

#### 4.4 Análise do comprimento dos telómeros no Grupo AVC

Analisando o comprimento dos telómeros do grupo controlo *versus* grupo AVC, observamos que as mulheres do grupo controlo apresentam maior comprimento dos telómeros comparativamente às mulheres do grupo AVC, sendo este resultado estatisticamente significativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,9$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 11).

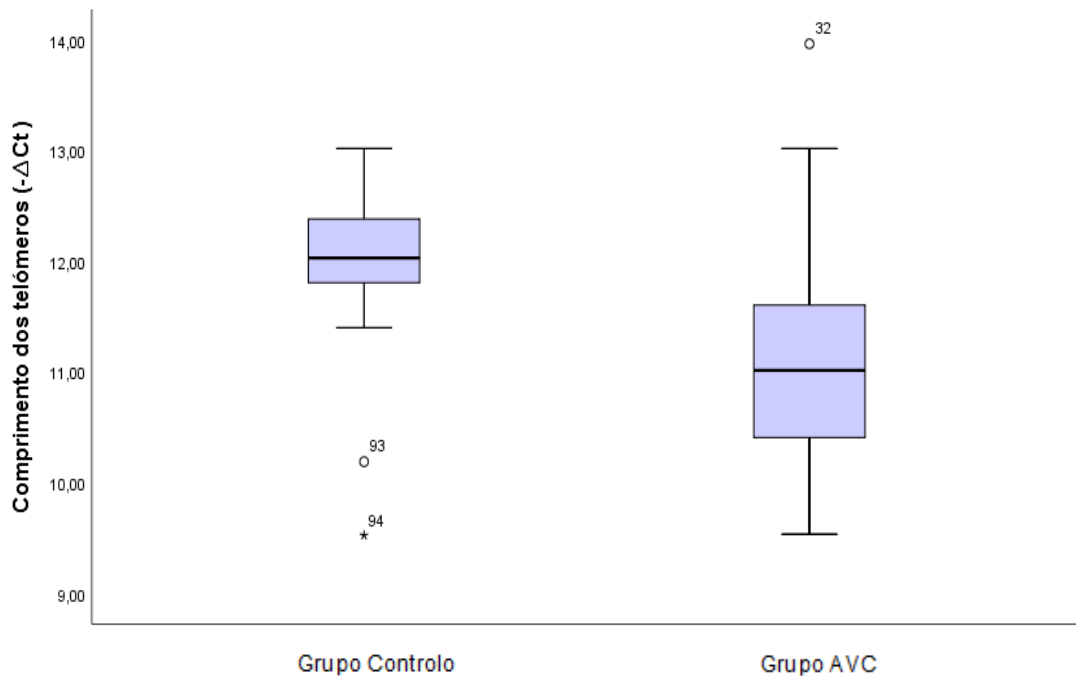


Figura 11 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controlo *versus* grupo AVC, no género feminino (média  $\pm$  desvio padrão).

Contrariamente, observamos que os homens do grupo controlo apresentam menor comprimento dos telómeros comparativamente aos homens do grupo AVC, sendo este resultado estatisticamente significativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,1$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 12).

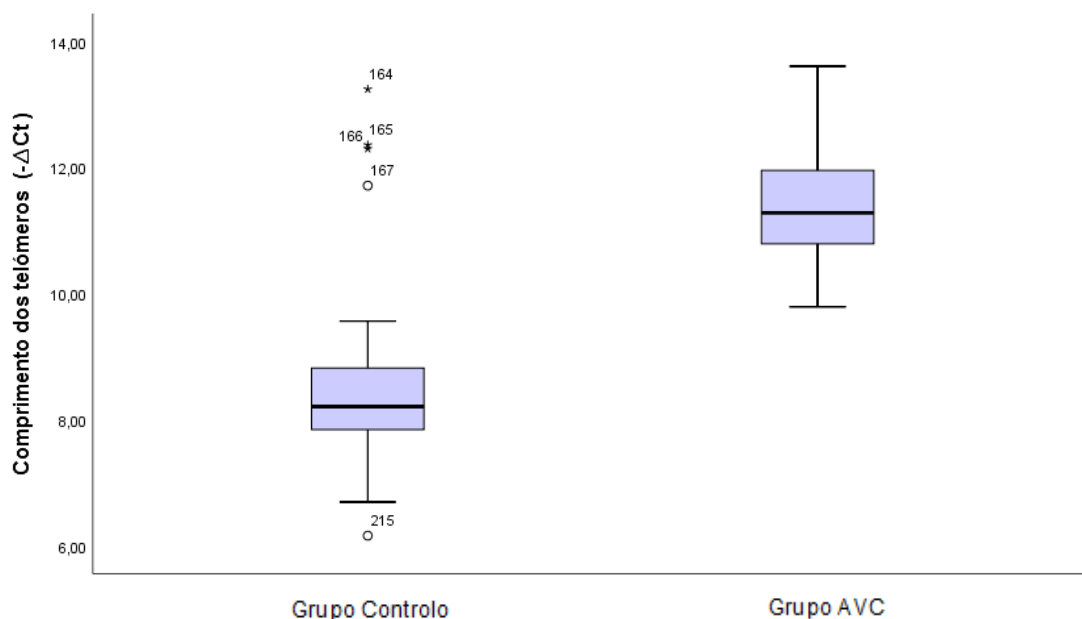


Figura 12 - Comparação do comprimento dos telómeros do grupo controlo *versus* grupo AVC, no género masculino (média  $\pm$  desvio padrão).

A população em estudo (grupo controlo e grupo AVC) foi estratificada em duas categorias considerando o comprimento dos telómeros: comprimento longo e comprimento curto. Esta divisão foi realizada considerando o valor da mediana do  $\Delta Ct$ , sendo este de 11,7 no género feminino e de 10,7 no género masculino. Na tabela 3 estão descritas as distribuições das frequências dos comprimentos dos telómeros entre o grupo controlo e o grupo AVC em ambos os géneros.

Verificamos que no grupo controlo, a frequência de mulheres que apresenta comprimentos longos de telómeros é de 0,82 e comprimentos curtos é de 0,18. No que diz respeito ao grupo de AVC a frequência de mulheres com comprimentos longos é de 0,24 e comprimentos curtos é de 0,76. Por sua vez, a frequência de homens do grupo controlo que apresentam comprimentos longos de telómeros é de 0,08 e comprimentos curtos é de 0,92. No grupo de AVC a frequência de homens com comprimentos longos é de 0,35 e comprimentos curtos é de 0,65 (Tabela 3).

Observou-se que as mulheres que têm telómeros mais curtos apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de AVC, comparativamente às que têm telómeros mais longos (OR= 14,8; IC 95%: 5,29 - 41,26;  $P < 0,001$ ). Contrariamente, homens com

telômeros mais curtos apresentam um risco reduzido relativamente aos que têm telômeros mais longos (OR= 0,16; IC 95%: 0,05 - 0,49;  $P < 0,001$ ) (Tabela 3).

Tabela 3- Distribuição das frequências de telômeros no grupo controlo e no grupo de AVC de acordo com o seu comprimento e análise de OR.

		Grupo Controlo n (frequência)	Grupo AVC n (frequência)	OR	IC 95%	P
Mulheres	Comprimento longo	32 (0,82)	13 (0,24)	1,00	Referência	
	Comprimento curto	7 (0,18)	42 (0,76)	14,80	5,29 – 41,26	<0,001
Homens	Comprimento longo	4 (0,08)	24 (0,35)	1,00	Referência	
	Comprimento curto	48 (0,92)	45 (0,65)	0,16	0,05 – 0,49	<0,001

OR: Odds Ratio; IC 95%: intervalo confiança a 95%; P: teste  $X^2$

Relativamente aos hábitos tabágicos não verificamos diferenças estatisticamente significativas nas mulheres do grupo AVC (fumadoras *versus* não-fumadoras,  $P = 0,735$ ) (Figura 13).

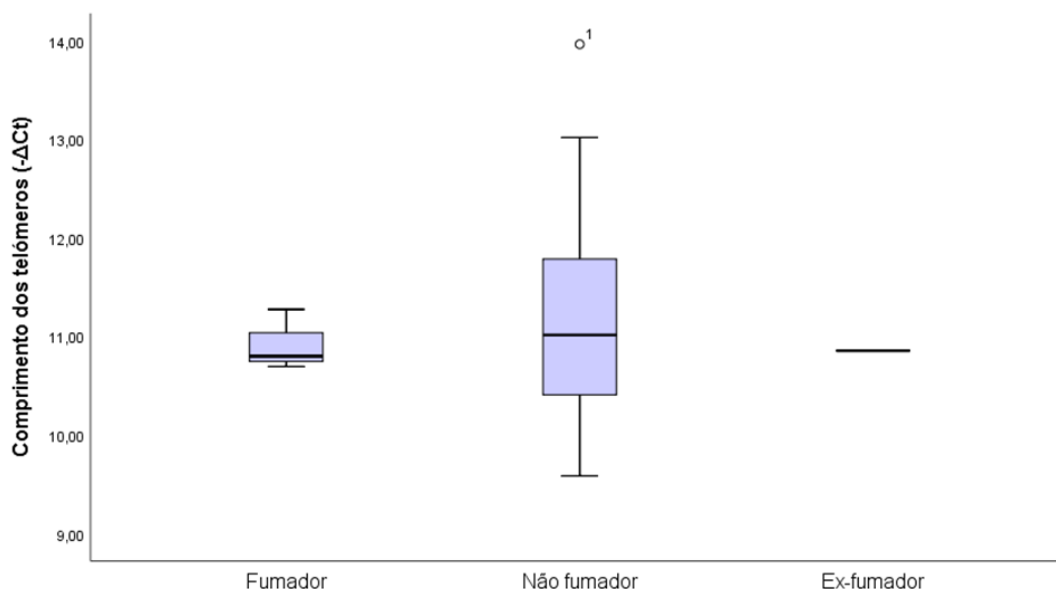


Figura 13 - Comprimento dos telômeros no grupo AVC segundo a variável hábitos tabágicos, no género feminino (média  $\pm$  desvio padrão).

Relativamente aos hábitos tabágicos não verificamos diferenças estatisticamente significativas nos homens do grupo AVC (fumadores *versus* não-fumadores,  $P = 0,746$ ; fumadores *versus* ex-fumadores,  $P = 0,950$ ) (Figura 14).

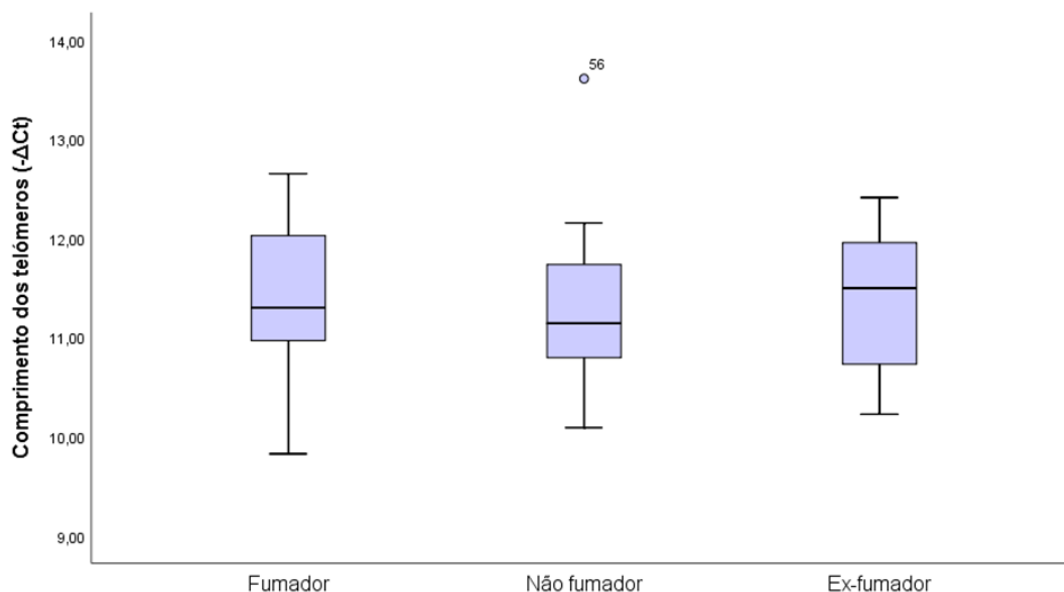


Figura 14 - Comprimento dos telómeros no grupo AVC segundo a variável hábitos tabágicos, no género masculino (média  $\pm$  desvio padrão).

Relativamente ao IMC, verifica-se que 35,8% do Grupo AVC apresenta um IMC saudável e 64,2% dos indivíduos apresenta IMC's de Sobrepeso, Obesidade Grau I e II. Nos indivíduos do grupo controlo 31,9% apresenta um IMC saudável e 68,1% apresenta IMC's de Sobrepeso, Obesidade Grau I e II.



# DISCUSSÃO





## 5. DISCUSSÃO

O envelhecimento da população humana é um processo complexo que ocorre gradualmente, diferindo de indivíduo para indivíduo. O indicador mais comum na avaliação do processo de envelhecimento é a idade cronológica, na qual por cada ano de vida dos indivíduos, se acrescenta um ano à sua idade. O estabelecimento da idade dos indivíduos é fundamental na área da Medicina Legal e Ciências Forenses, uma vez que contribui para o processo de identificação dos indivíduos. As técnicas convencionais de estimativa de idade que se realizam mais frequentemente dependem da análise das características morfológicas dos dentes ou de características esqueléticas de indivíduos vivos ou mortos e apresentam uma elevada taxa de erro associado (17). Porém, esta informação pode não ser suficiente nas várias áreas da Medicina Legal. Sendo assim, a determinação da idade biológica pode ser um complemento útil à idade cronológica, já que indivíduos com a mesma idade podem apresentar diferentes níveis de disfunções e vulnerabilidades à medida que vão envelhecendo e por isso, apresentar idades biológicas diferentes (11) (25).

O envelhecimento biológico é um processo complexo, no qual intervêm vários mecanismos e moléculas. Uma das principais estruturas biológicas envolvidas neste processo são os telómeros. Ao seu encurtamento contínuo durante a divisão celular é atribuída grande responsabilidade no processo de envelhecimento biológico. Assim, o comprimento dos telómeros está estreitamente ligado com mecanismos fisiológicos, genéticos e externos, dos quais são exemplo, o stress oxidativo, processos inflamatórios, senescência celular, o género, o stress e o fumo do tabaco, bem como determinadas doenças crónicas, de que são exemplo o cancro e as doenças cardiovasculares, duas das doenças responsáveis pelos maiores índices de mortalidade mundiais (7) (24) (32) (47) (68).

Deste modo, a caracterização do comprimento dos telómeros em diversas populações, saudáveis ou com determinadas patologias, de diversas idades é extremamente útil para poder avaliar o seu papel como possível biomarcador de idade biológica.

Assim, no presente estudo analisou-se o comprimento dos telómeros de indivíduos saudáveis, indivíduos diagnosticados com CaP ou com AVC, de forma a complementar a informação já existente da associação do tamanho dos telómeros com a idade biológica.

Neste estudo o comprimento dos telómeros foi determinado pelo método de qPCR a partir de amostras de sangue periférico. Apesar da pureza e da quantidade de DNA das amostras ser relativamente baixa verificámos que a percentagem de deteção média foi de aproximadamente 100%. Estes resultados apontam para uma elevada sensibilidade do método de qPCR na determinação do tamanho dos telómeros, apesar da dificuldade esperada já que estes se localizam nas regiões terminais dos cromossomas. Assim, este é um método que apresenta bons resultados mesmo em amostras antigas e com baixa qualidade de DNA, o que pode ser favorável para aplicação nas ciências forenses, uma vez que as amostras em locais de crime se encontram por vezes bastante degradadas, podendo também apresentar inibidores das reações de PCR. Para além disso, o facto de ser necessária pouca quantidade de DNA é vantajoso pois a recolha de evidências em locais de crime restringe-se na maioria das vezes a pequenas amostras de fluidos biológicos e com este método não seria necessário recolher uma nova amostra.

A associação entre a idade cronológica do grupo controlo e o comprimento dos seus telómeros não revelou diferenças estatisticamente significativas, o que nos leva a pressupor que o comprimento dos telómeros não é um bom preditor da idade cronológica dos indivíduos. Estes resultados estão de acordo com o descrito num artigo de revisão de Blackburn e colaboradores, que refere que a idade cronológica é responsável por menos de 10% da variação do comprimento dos telómeros humanos (28) e com as conclusões do estudo de Hewakapuge e colaboradores, que atribui as variações do comprimento dos telómeros à presença de elevadas diferenças interindividuais na população, tais como diferenças de comprimento dos telómeros ao nascimento, diferenças de perdas teloméricas entre homens e mulheres, perdas não lineares nos diferentes estádios da vida, fatores genéticos e estilo de vida dos indivíduos (73). Portanto, a medição do comprimento dos telómeros, por si só, não é suficiente para prever a idade cronológica de um indivíduo.

No que concerne ao género, neste estudo, os indivíduos do género feminino apresentavam um comprimento de telómeros significativamente superior ao dos indivíduos do género masculino. Esta observação é corroborada pelos estudos de Dalgård, Lapham, Hewakapuge e colaboradores que também relataram estas diferenças. De facto, estes estudos referem que o maior comprimento dos telómeros no género feminino pode ser explicado pela estimulação do promotor da subunidade catalítica da enzima telomerase hTERT pelo estrogénio, que dessa forma atenua a taxa de encurtamento dos telómeros. As mulheres têm um nível mais elevado de estrogénio em comparação com os homens e portanto, a regulação da enzima telomerase é diferente entre os dois sexos (73) (74) (75).

Relativamente aos fatores de estilo de vida que influenciam o comprimento dos telómeros, um dos que apresenta maior relevância é o consumo tabágico, pois a exposição às substâncias químicas nocivas dos cigarros pode induzir stress oxidativo e inflamação que, por sua vez causa danos irreparáveis no DNA telomérico (76). No presente estudo, indivíduos fumadores com idade inferior a 36 anos apresentavam um comprimento telomérico significativamente menor quando comparados com os indivíduos da mesma idade e não fumadores. Porém, não observámos diferenças estatisticamente significativas quando comparados os comprimentos dos telómeros nos indivíduos ex-fumadores com os não fumadores, nem entre fumadores, não fumadores e ex-fumadores com mais de 36 anos. Resultados provenientes de uma meta-análise que avaliou as evidências que associam o tabagismo ao comprimento telomérico concluíram que o comprimento dos telómeros é mais curto entre os indivíduos fumadores, em comparação com aqueles que não são fumadores (46). Um estudo realizado por Valdes e colaboradores indica que o DNA telomérico é perdido a uma taxa média de 25,7 a 27,7 pares de bases por ano e com o consumo diário de um maço de cigarros, há uma perda adicional de 5 pares de bases. Portanto, o desgaste nos telómeros causado pelo consumo de um maço de cigarros por dia durante um período de 40 anos pode ser equivalente a 7,4 anos de vida perdidos (77). É de realçar que existem diferenças consideráveis entre os IMC's dos indivíduos em estudo com mais de 36 anos e com menos de 36 anos, sendo que a população mais velha apresenta, quase na totalidade IMC acima do saudável. O sobrepeso e obesidade neste grupo poderá explicar o porquê de, no nosso estudo, as diferenças no

comprimento dos telómeros de fumadores, ex-fumadores e não-fumadores não serem significativas, já que este comprimento pode estar a ser influenciado pelo IMC.

De facto, a relação entre a obesidade e o encurtamento dos telómeros tem sido estudada ao longo dos anos. Shammas, Mundstock e colaboradores destacam o aumento do stress oxidativo, de espécies reativas de oxigénio, dos processos inflamatórios relacionados com a obesidade e a desregulação na produção de adipocitocinas como principais fatores que podem explicar a associação entre a obesidade e o encurtamento dos telómeros (78) (79). Para além disso, a hipótese que podemos colocar é que nos indivíduos jovens os efeitos do tabaco têm consequências nefastas diretas que podem ser observadas pela diminuição do comprimento dos telómeros. No entanto, em indivíduos mais velhos as células já se encontram comprometidas devido à ação de fatores de risco a que foram sujeitas com o passar dos anos. Assim sendo, os telómeros mantêm um comprimento curto ou longo consoante os efeitos de risco a que foram sujeitos nesse período de tempo. Há efetivamente estudos que apoiam esta hipótese sugerindo que a influência na dinâmica de encurtamento dos telómeros é superior em idades mais jovens. Consequentemente, a maioria dos indivíduos que chega à idade adulta com telómeros curtos ou longos, mantêm essa tendência ao longo da vida (80) (81).

Quando fomos observar o comprimento dos telómeros dos indivíduos do género masculino diagnosticados com CaP, verificamos que estes apresentavam um comprimento inferior comparativamente aos indivíduos do grupo controlo, o que vai ao encontro dos resultados dos estudos de Hou, Shay, Wentzensen, Graham e colaboradores (45) (71) (82) (83). Cumulativamente, os indivíduos com telómeros mais curtos apresentavam um risco superior para o desenvolvimento de CaP comparativamente aos indivíduos que têm telómeros mais longos. Esta observação foi também verificada nos estudos de Heaphy, Hou e colaboradores, que concluíram que homens com menores comprimentos de telómeros estavam positivamente associados a um maior risco de desenvolver CaP e destes apresentarem um pior prognóstico (82) (84).

O encurtamento dos telómeros é um dos processos moleculares que podem gerar instabilidade genómica e dar início à tumorigénese da próstata (82). Também a inflamação é um componente importante na iniciação e progressão dos vários tipos de

cancro, incluindo no CaP. A associação entre o encurtamento dos telómeros e o CaP pode ser explicada, em parte, pela sensibilidade dos telómeros a danos causados por stress oxidativo cumulativo e inflamação crónica do tecido prostático, que pode ser desencadeada por exemplo por agentes infecciosos, fatores dietéticos e irritação física e química do refluxo urinário (71).

Relativamente ao grupo AVC, observaram-se comprimentos inferiores dos telómeros nas mulheres com diagnóstico de AVC relativamente às mulheres saudáveis. Consequentemente as mulheres com telómeros mais curtos apresentavam um risco significativamente superior de desenvolverem AVC. Um estudo recente de Luo efetuado na população chinesa e um estudo de Fyhrquist e colaboradores elaborado na população finlandesa corroboram estas observações mostrando que o comprimento curto dos telómeros está associado a um risco elevado de AVC isquémico em mulheres integradas em grupos de alto risco (51) (62). Os fatores de risco mais relevantes para o desenvolvimento de AVC's nas mulheres são o aumento da idade e a diminuição hormonal de estrogénio, existindo por isso uma maior incidência de AVC's em mulheres pós-menopáusicas, comparativamente a mulheres pré-menopáusicas. Sendo assim, um início precoce da menopausa e a conseqüente redução de exposição ao estrogénio estão associados a um menor comprimento dos telómeros nas mulheres pós-menopáusicas (74) (85) (86). Nas mulheres pré-menopáusicas a presença do estrogénio tem um efeito estimulador na enzima telomerase e há evidências de que esta hormona apresenta propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, revelando um potencial preventivo no desenvolvimento de AVC (87). Considerando que as mulheres do nosso grupo controlo apresentam uma média de idades de aproximadamente 40 anos e as do grupo de AVC aproximadamente 70 anos, as últimas terão níveis consideravelmente mais baixos de estrogénio, o que levará a um menor estímulo da telomerase e por isso a telómeros mais curtos.

Contrariamente, nos indivíduos do género masculino verificou-se uma inversão dos resultados quando comparámos os indivíduos saudáveis com os indivíduos diagnosticados com AVC. Também nos estudos de Epel e de Luo e colaboradores se verificaram aumentos no comprimento dos telómeros de indivíduos do género masculino em patologias cardiovasculares comparativamente aos grupos controlo constituídos por indivíduos saudáveis (62) (88). Há evidências de que genes no

cromossoma Y estejam parcialmente envolvidos no aumento da pressão arterial observada nos homens, fator de risco para o desenvolvimento de AVC (86). Além disso, nos indivíduos do sexo masculino, a telomerase é induzida pela presença da testosterona, o androgénio masculino. Deste modo, níveis aumentados de testosterona estão associados a um aumento do comprimento dos telómeros (50). No entanto, a testosterona é responsável por induzir calcificação vascular. Este processo patológico envolve a deposição de cristais de hidroxapatite em tecidos cardiovasculares, o que pode conduzir ao desenvolvimento de aterosclerose e consequentemente ao aumento do risco de AVC (89). Elevados níveis de testosterona e, por consequência, comprimentos de telómeros mais longos podem afetar a estabilidade da placa aterosclerótica, a formação de coágulos, processos inflamatórios ou outros mecanismos não relacionados com a idade que podem tornar alguns homens suscetíveis a eventos precoces de AVC (90). De acordo com os resultados observados no grupo de indivíduos com AVC salienta-se a influência de variáveis como o género e níveis hormonais no comprimento dos telómeros mesmo na presença de uma patologia de base, tornando-se necessária a contextualização da população em geral para a utilização deste biomarcador.

Os resultados do presente estudo demonstram a importância do estudo dos telómeros como biomarcadores de envelhecimento, que permitem identificar indivíduos cuja idade biológica diverge da idade cronológica estabelecida pelo passar dos anos devido a variações de género, de hábitos tabágicos, do seu estilo de vida e/ou de patologias prévias.

**CONCLUSÃO E  
PERSPETIVAS  
FUTURAS**





## 6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

No contexto da Medicina Legal, estabelecer a idade de pessoas desconhecidas, ou de pessoas com idade desconhecida, pode fornecer pistas importantes em investigações criminais, na identificação de vítimas de desastres, em casos de fraude ou noutros assuntos jurídicos. Para além das limitações já conhecidas dos métodos convencionais de determinação de idade baseados em características morfológicas dos indivíduos, existem inúmeras situações em que é necessária a identificação da idade biológica de um indivíduo em detrimento da idade cronológica.

Um dos biomarcadores mais importantes no estudo das variações moleculares que ocorrem à medida que o indivíduo vai envelhecendo, e por isso um potencial biomarcador de idade biológica, é o comprimento dos telómeros, pois estas estruturas encontram-se na extremidade de todos os cromossomas e encurtam à medida que os indivíduos envelhecem.

Neste estudo foi determinado o comprimento dos telómeros de indivíduos saudáveis, com diagnóstico de CaP ou de AVC.

Os resultados do presente estudo mostraram que o método de qPCR para a determinação do comprimento telomérico apresenta inúmeras vantagens, pois requer pouca quantidade e qualidade de amostra de DNA inicial e a técnica laboratorial é simples e rápida, comparativamente aos outros métodos disponíveis, reduzindo assim a possibilidade de contaminações e erros. Deste modo, este método poderia ser utilizado em amostras em contexto forense, mesmo que estas apresentem algum estado de degradação.

A presença de variações interindividuais, como o género, os hábitos tabágicos ou o índice de massa corporal influenciam o comprimento dos telómeros e impedem a previsão de uma idade cronológica com precisão, pelo que o estudo do comprimento telomérico não se apresenta como uma alternativa aos métodos tradicionais do estabelecimento da idade cronológica dos indivíduos utilizados na medicina legal, mas permite a melhor caracterização de uma idade biológica, mesmo em ausência de patologias.

A variação do comprimento dos telómeros em indivíduos com patologias como CaP ou AVC em relação aos indivíduos saudáveis, reforçam esta caracterização como biomarcador de idade biológica. Para além disso, em ambas as patologias o comprimento dos telómeros poderá ser útil para identificar indivíduos em risco de desenvolver CaP ou AVC.

Dada a sua potencialidade como marcador de idade biológica, o comprimento dos telómeros tem bastantes aplicações em Medicina Legal. Uma delas é, por exemplo, a avaliação do impacto de fatores externos na vida dos indivíduos. Estudos demonstram que o encurtamento dos telómeros pode ser acelerado pela exposição a fatores de stress agudo ou crónico no ambiente social dos indivíduos, como por exemplo pelo facto de serem vítimas de maus tratos na infância, assim como sofrerem de *bullying*, discriminação racial ou violência doméstica. Existe também uma forte associação entre a persistência de distúrbios psiquiátricos, como depressões prolongadas, distúrbios de ansiedade generalizados ou distúrbios de stress pós-traumático, que conduzem a um envelhecimento precoce e a uma prematura mortalidade (91) (92) (93).

O estudo dos telómeros poderia também ser aplicado em casos de avaliação do estado de saúde dos indivíduos para atribuição de apólices de seguros de vida, em casos de avaliação do grau de invalidez em juntas médicas para atribuições de reformas precoces e ainda possibilitar o estabelecimento causal entre o efeito de um fator de risco e o desenvolvimento de doenças profissionais.

Uma outra aplicação vantajosa com o estabelecimento da idade biológica dos indivíduos é a distinção entre gémeos homozigóticos. Estes indivíduos apesar de possuírem o mesmo material genético, apresentam diferentes suscetibilidades relacionadas com fatores do seu estilo de vida, que lhes irão conferir diferenças na sua idade biológica.

Este estudo apresenta ainda algumas limitações. A ausência de diferenças significativas no comprimento dos telómeros em indivíduos saudáveis fumadores, ex-fumadores e não fumadores, quando estes apresentam idade superior ou igual a 36 anos parece dever-se ao IMC não saudável predominante nestes grupos. No entanto, para comprovar essa hipótese, seria necessário estratificar os três grupos de acordo com os seus IMC's. Neste estudo isso não foi possível já que os grupos não apresentavam tamanho suficiente para realizar a análise estatística apropriada. Assim,

no futuro, era importante alargar a amostra de indivíduos saudáveis e realizar a estratificação dos grupos, para comprovar a influência do IMC e dos hábitos tabágicos no comprimento dos telómeros. Adicionalmente, seria importante o alargamento do número de indivíduos de todos os grupos para consolidar os resultados obtidos.

Para além disso, nos AVC's as diferenças observadas nos comprimentos de telómeros em mulheres e homens diagnosticados com AVC em relação aos indivíduos controlo parecem ser resultantes dos efeitos das hormonas sexuais mais predominantes em cada género. Em estudos futuros seria necessário um estudo mais pormenorizado dos níveis de estrogénio e testosterona, de modo a esclarecer qual o efeito destas hormonas na variação do comprimento dos telómeros nas diversas faixas etárias.

Por fim, seria interessante no contexto da medicina legal futuramente a aplicação do estudo do comprimento dos telómeros em vítimas de maus tratos, de *bullying*, de discriminação racial ou de violência doméstica, de modo a avaliar o envelhecimento biológico a que estes indivíduos estão sujeitos devido às adversidades que sofrem no seu dia-a-dia.



**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**





## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida A, Ribeiro T, Medeiros I. Aging : Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev.*;2017(1):19.
2. Kirkland J, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*;2017:21–8.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>
3. McDaid A, Joshi P, Porcu E, Komljenovic A, Li H, Sorrentino V, et al. Bayesian association scan reveals loci associated with human lifespan and linked biomarkers. *Nat Commun.* 2017;8:11.
4. Kulminski A, Culminskaya I. Genomics of human health and aging. *Age (Omaha).* 2013;35(2):455–69.
5. Sindi S, Ngandu T, Hovatta I, K'areholt I, Antikainen R, Hänninen T, et al. Baseline telomere length and effects of a multidomain lifestyle intervention on cognition: The FINGER randomized controlled trial. *J Alzheimer's Dis.* 2017;59(4):1459–70.
6. O'Callaghan N, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online.* BioMed Central Ltd; 2011;13(1):3. Available from: <http://www.biologicalproceduresonline.com/content/13/1/3>
7. Chilton W, O'Brien B, Charchar F. Telomeres, aging and exercise: Guilty by association? *Int J Mol Sci.* 2017;18(2573):32.
8. Zhao Y, Li S, Liu H. Estimating the survival advantage based on telomere length and serum biomarkers of aging. *J Transl Med.* BioMed Central; 2017;15:1–7.
9. Bürkle A, Moreno-Villanueva M, Bernhard J, Blasco M, et al. MARK-AGE biomarkers of ageing. Elsevier Ireland Ltd; 2015;151:2–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2015.03.006>
10. Mather K, Jorm A, Parslow R, Christensen H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *Journals Gerontol -Biological Sci Med Sci.* 2011;66 A(2):202–13.
11. Zhang W, Zhu S, Bai X. Select aging biomarkers based on telomere length and chronological age to build a biological age equation. *Age (Omaha).* 2014;36(1):1201–

- 11.
12. Belsky D, Moffitt T, Cohen A, Corcoran D, Levine M. Eleven Telomere, Epigenetic Clock, and Biomarker-Composite Quantifications of Biological Aging: Do They Measure the Same Thing? Oxford Univ Press. 2017;1(1):23.
13. Soriano-Tárraga C, Giralt-Steinhauer E, Mola-Caminal M, Vivanco-Hidalgo RM, Ois A, Rodríguez-Campello A, et al. Ischemic stroke patients are biologically older than their chronological age. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(11):2655–66.
14. Saeed M, Berlin R, Dawson T. Exploring the utility of genetic markers for predicting biological age. *Leg Med. Elsevier Ireland Ltd*; 2012;14(6):279–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.05.003>
15. Calabuig G, Cañadas E. *Medicina legal y toxicología*. 6ª. Madrid: Masson, SA; 2004. 1377 p.
16. Krishan K, Kanchan T, Garg A. Dental Evidence in Forensic Identification - An Overview, Methodology and Present Status. *Open Dent J*. 2015;9(1):250–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312096> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4541412>
17. Santoro V, De Donno A, Marrone M, Campobasso C Pietro, Introna F. Forensic age estimation of living individuals: A retrospective analysis. *Forensic Sci Int*. 2009;193:1–4.
18. Javadinejad S, Sekhavati H, Ghafari R. A Comparison of the Accuracy of Four Age Estimation Methods Based on Panoramic Radiography of Developing Teeth. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015;9(2):72–8. Available from: <http://dentistry.tbzmed.ac.ir/joddd/index.php/joddd/article/view/1500>
19. Cattaneo C. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2–3):185–93.
20. Rösing F, Graw M, Marré B, Ritz-Timme S, Rothschild M, Röttscher K, et al. Recommendations for the forensic diagnosis of sex and age from skeletons. *HOMO- J Comp Hum Biol*. 2007;58(1):75–89.
21. Balistreri C, Pisano C, Martorana A, Triolo O, Lio D, Candore G, et al. Are the leukocyte telomere length attrition and telomerase activity alteration potential

- predictor biomarkers for sporadic TAA in aged individuals? *Age (Omaha)*. 2014;36(5).
22. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools). Food Drug Adm Silver Spring. 2018;(1):55. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc237.pdf>
23. WHO. Environmental Health Criteria 237, Principles for Evaluating Health Risks in Children Associated with Exposure to Chemical. *Environ Heal Criteria*. 2006;237:323. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc237.pdf>
24. Hastings W, Shalev I, Belsky D. Translating measures of biological aging to test effectiveness of geroprotective interventions: What can we learn from research on telomeres? *Front Genet*. 2017;8(164):1–8.
25. Jylhävä J, Pedersen N, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine*. The Authors;2017;21:29–36.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.046>
26. Xia X, Chen W, McDermott J, Han J-DJ. Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Research*. 2017;6(1):860.  
Available from: <https://f1000research.com/articles/6-860/v1>
27. Dong Y, Huang Y, Gutin B, Raed A, Dong Y, Zhu H. Associations between Global DNA Methylation and Telomere Length in Healthy Adolescents. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7(1):1–6.
28. Blackburn E, Epel E, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (80)*. 2015;350(6265):1193–8.
29. Marioni R, Harris S, Shah S, McRae A, von Zglinicki T, Martin-Ruiz C, et al. The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int J Epidemiol*. 2016;45(2):424–32.
30. Weidner C, Lin Q, Koch C, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. 2014;15(2).
31. Chen B, Carty C, Kimura M, Kark J, Chen W, Li S, et al. Leukocyte telomere length, T cell composition and DNA methylation age. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(9):1983–

- 95.
32. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Matsuda Y, Arai T, et al. Changes of telomere status with aging: An update. *Geriatr Gerontol Int*. 2016;16(1):30–42.
33. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley K, Dunning A, et al. Shortened Telomere length is associated with increased risk of cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(6):1–9.
34. Victorelli S, Passos J. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*. The Authors; 2017;21(1):14–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.027>
35. Magalhães J, Passos J. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*. Elsevier; 2018;170(March 2017):2–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.001>
36. Montpetit A, Alhareeri A, Montpetit M, Starkweather A, Elmore L. Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Nurs Res*. 2014;63(4):289–99.
37. Kirchner H, Shaheen F, Kalscheuer H, Schmid S, Oster H, Lehnert H. The telomeric complex and metabolic disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(176):1–13.
38. Flores I, Blasco M. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett*. Federation of European Biochemical Societies; 2010;584(17):3826–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.042>
39. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer*. 2007;96(7):1020–4.
40. Shay J. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov*. American Association for Cancer Research; 2016 Jun 1;6(6):584–93. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>
41. Jäger K, Walter M. Therapeutic targeting of telomerase. *Genes (Basel)*. 2016;7(39):1–24.
42. Simons M. Questioning causal involvement of telomeres in aging. *Ageing Res Rev*. Elsevier B.V.; 2015;24:191–6.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.002>

43. Faragher R, McArdle A, Willows A, Ostler E. Senescence in the aging process. *F1000Research*. 2017;6(1):1–9. Available from: <https://f1000research.com/articles/6-1219/v1>
44. Heaphy C, Meeker A. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1227–38.
45. Shay J. Are Short Telomeres Predictive of Advanced Cancer? *Cancer Discov*. 2013;3(10):1–6.
46. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res. Elsevier Inc.*;2017;158(March):480–9.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.038>
47. Fernández-Alvira J, Fuster V, Dorado B, Soberón N, Flores I, Gallardo M, et al. Short Telomere Load, Telomere Length, and Subclinical Atherosclerosis: The PESA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(21):2467–76.
48. Benetos A, Toupance S, Gautier S, Labat C, Kimura M, Rossi P, et al. Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis: Blood-and-Muscle Model. *Circ Res*. 2017;1(1):14. Available from: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.311751>
49. Aviv A, Levy D. Telomeres, Atherosclerosis, and the Hemothelium: The Longer View. *Annu Rev Med*. 2012;63(1):293–301.
50. Cheng Y-Y, Kao T-W, Chang Y-W, Wu C-J, Peng T-C, Wu L-W, et al. Examining the gender difference in the association between metabolic syndrome and the mean leukocyte telomere length. *PLoS One*. 2017;12(7):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28686726> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5501587> <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0180687>
51. Fyhrquist F, Silventoinen K, Saijonmaa O, Kontula K, Devereux R, et al. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: The LIFE study. *J Hum Hypertens*. 2011;25(12):711–8.

52. Zhang C, Doherty J, Burgess S, Hung R, Lindström S, Kraft P, et al. Genetic determinants of telomere length and risk of common cancers: A Mendelian randomization study. *Hum Mol Genet.* 2015;24(18):5356–66.
53. Stout S, Lin J, Hernandez N, Davis E, Blackburn E, Carroll J, et al. Validation of minimally-invasive sample collection methods for measurement of telomere length. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(1):1–6.
54. Kimura M, Stone R, Hunt S, Skurnick J, Lu X, Cao X, et al. Measurement of telomere length by the southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat Protoc.* 2010;5(9):1596–607.
55. Cawthon R. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):47e–47. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.10.e47>
56. Cawthon R. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):1–7.
57. Bendix L, Horn P, Jensen U, Rubelj I, Kolvraa S. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell.* 2010;9(3):383–97.
58. Aubert G, Hills M, Lansdorp P. Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res. Elsevier B.V.;* 2012;730(1–2):59–67.  
Availablefrom:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003>
59. Vera E, Blasco M. Beyond average: Potential for measurement of short telomeres. *Aging (Albany NY).* 2012;4(6):379–92.
60. Ding H, Chen C, Shaffer J, Liu L, Xu Y, Wang X, et al. Telomere length and risk of stroke in Chinese. *Stroke.* 2012;43(3):658–63.
61. Li J, Feng C, Li L, Yang S, Chen Y, Hui R, et al. The association of telomere attrition with first-onset stroke in Southern Chinese: A case-control study and meta-analysis. *SciRep.SpringerUS;*2018;8(1):1–11.  
Availablefrom:<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20434-w>
62. Luo D, Hou Q, Yu J, Yu D. Telomere length associated with the risks of high-risk

- and ischemic stroke in southern Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017;8(62):105915–22.
63. Thrift A, Thayabaranathan T, Howard G, Howard V, Rothwell P, Feigin V, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke*. 2017;12(1):13–32.
64. Wilson W, Herbert K, Mistry Y, Stevens S, Patel H, Hastings R, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J*. 2008;29(21):2689–94.
65. Zhang W, Chen Y, Wang Y, Liu P, Zhang M, Zhang C, et al. Short telomere length in blood leucocytes contributes to the presence of atherothrombotic stroke and haemorrhagic stroke and risk of post-stroke death. *Clin Sci*. 2013;125(1):27–43. Available from: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20120691>
66. Zee R, Castonguay A, Barton N, Ridker P. Relative Leukocyte Telomere Length and Risk of Incident Ischemic Stroke in Men: A Prospective, Nested Case-Control Approach. *Rejuvenation Res*. 2010;13(4):411–4. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/rej.2009.0975>
67. Schürks M, Prescott J, Dushkes R, De Vivo I, Rexrode K. Telomere Length and Ischemic Stroke in Women: A Nested Case-Control Study. *Eur J Neurol*. 2013;20(7):1068–74.
68. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
69. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. In: *Direção Geral da Saúde*. 2017.p.24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844697>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5961643>
70. Filella X, Fernández-Galan E, Fernández Bonifacio R, Foj L. Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics Pers Med*. 2018;11:83–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844697>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5961643>
71. Graham M, Meeker A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat Rev Urol*. 2017;14(10):607–19.

72. Zhu X, Han W, Xue W, Zou Y, Xie C, Du J, et al. The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2016;6:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep22243>
73. Hewakapuge S, van Oorschot R, Lewandowski P, Baidur-Hudson S. Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Leg Med.* 2008;10(5):236–42.
74. Dalgård C, Benetos A, Verhulst S, Labat C, Kark J, Christensen K, et al. Leukocyte telomere length dynamics in women and men: Menopause vs age effects. *Int J Epidemiol.* 2015;44(5):1688–95.
75. Lapham K, Kvale M, Lin J, Connell S, Croen L, Dispensa B, et al. Automated assay of telomere length measurement and informatics for 100,000 subjects in the genetic epidemiology research on adult health and aging (GERA) cohort. *Genetics.* 2015;200(4):1061–72.
76. Alexandrov L, Ju Y, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, et al. Mutation signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* (80). 2016;354(6312):618–22. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
77. Valdes A, Andrew T, Gardner J, Kimura M, Oelsner E, Cherkas L, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet.* 2005;366(1):662–4.
78. Shammass M. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* Telomeres, lifestyle, cancer and aging. 2012;14(1):28–34.
79. Mundstock E, Sarria E, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, et al. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity.* 2015;23(11):2165–74.
80. Aviv A, Shay J. Reflections on telomere dynamics and ageing-related diseases in humans. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018;373(1741).
81. Benetos A, Kark J, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, et al. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell.* 2013;12(4):615–21.
82. Hou L, Joyce B, Gao T, Liu L, Zheng Y, Penedo F, et al. Blood Telomere Length Attrition and Cancer Development in the Normative Aging Study Cohort.

- EBioMedicine. Elsevier B.V.; 2015;2(6):591–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.04.008>
83. Wentzensen I, Mirabello L, Pfeiffer R, Savage S. The association of telomere length and cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(6):1238–50.
84. Heaphy C et al. Prostate Cancer Cell Telomere Length Variability and Stromal Cell Telomere Length as Prognostic Markers for Metastasis and Death. *Cancer Discov.* 2013;3(10):1130–41.
85. Walker A, Morgan R, Ives S, Cawthon R. Age-related arterial telomere uncapping and senescence is greater in women compared with men. *Exp Gerontol.* 2016;73(1):65–71.
86. Haast R, Gustafson D, Kiliaan A. Sex Differences in Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* Nature Publishing Group; 2012;32(12):2100–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2012.141>
87. Koellhoffer E, McCullough L. The Effects of Estrogen in Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* 2013;4(4):390–401.
88. Epel E, Merkin S, Cawthon R, Blackburn E, Adler N, Pletcher M, et al. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging (Albany NY).* 2009;1(1):81–8.
89. Nicholls M. Men, testosterone, and arteriosclerosis. *Eur Heart J.* 2016;37(46):3430. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehw492>
90. Basaria S, Harman S, Travison T, Hodis H, Tsitouras P, Budoff M, et al. Effects of Testosterone Administration for 3 Years on Subclinical Atherosclerosis Progression in Older Men With Low or Low-Normal Testosterone Levels. *Jama.* 2015;314(6):570–81. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.8881>
91. Willis M, Reid S, Calvo E, Staudinger U, Factor-Litvak P. A scoping systematic review of social stressors and various measures of telomere length across the life course. *Ageing Res Rev.* Elsevier B.V.; 2018;47:89–104. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.006>

92. Shalev I, Moffitt T, Braithwaite A, Danese A. Internalizing Disorders and Leukocyte Telomere Erosion: A Prospective Study of Depression, Generalized Anxiety Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder. *Mol Psychiatry*. 2014;19(11):1163–70.
93. Wang X, Sundquist K, Hedelius A, Palmér K, Memon A, Sundquist J. Leukocyte telomere length and depression, anxiety and stress and adjustment disorders in primary health care patients. *BMC Psychiatry*.; 2017;17(1):1–10.