



Cindy Fonte Mogadouro

# A TELOMERASE E A MANUTENÇÃO DOS TELÓMEROS NO CANCRO: APLICAÇÃO TERAPÊUTICA

Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor José Custódio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cindy Fonte Mogadouro

# A Telomerase e a manutenção dos Telómeros no Cancro: aplicação terapêutica

Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo  
Professor Doutor José Custódio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

---

**Assinatura do Tutor**  
(Professor José Custódio)

---

**Assinatura da Aluna**  
(Cindy Mogadouro)

Eu, Cindy Fonte Mogadouro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas com o nº 20011155549, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

---

**Assinatura da Aluna**

(Cindy Mogadouro)

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	4
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
1. OS TELÓMEROS.....	9
1.1 Estrutura e função.....	9
1.2 Manutenção dos telómeros .....	10
2. A TELOMERASE.....	12
2.1 Estrutura e função .....	12
3. TELOMERASE, SENESCÊNCIA CELULAR E O CANCRO.....	13
4. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE .....	16
4.1 Regulação da transcrição da hTERT .....	17
4.2 Regulação pós-transcrição de hTERT .....	18
4.3 Regulação do recrutamento da telomerase.....	18
4.3.1 Complexo “shelterina” .....	18
4.3.2 Fatores acessórios às “shelterinas” .....	21
5. APLICAÇÃO TERAPÊUTICA NO CANCRO.....	23
CONCLUSÃO .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## ABREVIATURAS

ALT – alongamento alternativo dos telómeros

ATM – Proteína ataxia-telangiectasia mutada

ATR – Proteína ataxia-telangiectasia relacionada com Rad3

Cadeia- G – cadeia G-enriquecida

ERCC1 – *Excision repair cross-complementation group 1*

G – guanina

HR – Reparação por recombinação homóloga

hTER – RNA da telomerase humana

hTERT – subunidade catalítica da telomerase humana

iPARP – inibidores das polimerases poli(ADP-ribose)

MAPK – proteína cinase ativada por mitogénio

BRIT1/MCPHI – *Microcephalin 1*

mRNA – RNA mensageiro

ORC - *Origin recognition complex*

PARP – Polimerases poli(ADP-ribose)

PNUTS – *Phosphatase Nuclear Targeting Subunit*

POT1 – *Protection of telomeres protein 1*

Rap1 – *Repressor/activator protein 1*

RNAi – RNA interferência

RT – transcriptase reversa

TIN2 - *TRF1 interacting nuclear protein 2*

TPPI – *tripeptidyl-peptidase I*

TRF1 - *Telomeric repeat binding factor 1*

TRF2 - *Telomeric Repeat binding Factor 2*

WRN - *Werner syndrome RecQ like helicase*

XPF – *proteína ERCC4*

## RESUMO

O cancro é uma doença maligna que se caracteriza pela divisão e crescimento descontrolados das células devido a múltiplos danos no DNA que lhes conferem imortalidade (Sudhakar, 2009). Nas últimas décadas vários estudos têm-se focado na origem da imortalidade das células cancerígenas. Hoje sabe-se que as estruturas protetoras dos cromossomas – Telómeros - desempenham um papel crucial na programação da morte celular, nomeadamente, na senescência celular, responsável pelo envelhecimento humano. A falha deste procedimento leva a que as células ultrapassem o limite replicativo e desenvolvam a capacidade de proliferar indefinidamente. Os telómeros são estruturas nucleoproteicas de comprimento variável, presentes nas extremidades dos cromossomas. São constituídos por uma cadeia dupla de DNA, que consiste em repetições da sequência 5'-TTAGGG-3', e por proteínas do complexo “shelterina” (do inglês *shelter* que significa “abrigo” ou “proteção”) (Gomez et al., 2012). A manutenção dos telómeros é imprescindível para a divisão e crescimento celulares, pelo que a oncogénese está dependente da manutenção destas estruturas.

A manutenção dos telómeros depende da atividade de uma transcriptase reversa, designada por Telomerase. A telomerase é um complexo ribonucleoproteico com atividade catalítica constituída por uma parte central, que inclui a subunidade catalítica (hTERT), e pelo seu próprio RNA intrínseco (hTER), que serve de molde para a síntese de DNA telomérico e de outros componentes acessórios (Heeg, 2015). Sabe-se que, em 85% dos tumores, a aquisição de imortalidade pelas células é dependente da telomerase. Nos restantes 15% os telómeros são mantidos por mecanismos alternativos. A telomerase é a enzima responsável pela alongação dos telómeros durante a replicação e divisão celular e, portanto, pela manutenção dos telómeros ao longo das gerações.

Dada a relação entre a manutenção dos telómeros e a telomerase na oncogénese, pretende-se com este trabalho de revisão bibliográfica, caracterizar os principais aspetos estruturais e funcionais dos telómeros e da telomerase, bem como o seu papel na manutenção dos telómeros, como é regulado este processo e a sua aplicação terapêutica no tratamento do cancro, preferencialmente mais específico e menos tóxico do que as terapêuticas atuais.

**Palavras-chave:** telómeros, telomerase, manutenção dos telómeros, senescência celular, oncogénese.



## **ABSTRACT**

Cancer is a malignant disease characterized by uncontrolled division and growth of cells that acquire multiple DNA damage which are transferred from generation to generation, giving them immortality (Sudhakar, 2009). In the last decades several studies have focused on the origin of immortality of cancer cells. Today it is known that the protective structures of chromosomes — Telomeres - play a crucial role in the programmed cell death, particularly in cellular senescence responsible for human aging. If this procedure fails cells exceed the replicative limit and develop immortality. Telomeres are nucleoprotein structures with variable length, present at the end of chromosomes. Consists in repetitions of DNA sequences 5'-TTAGGG-3' in double strand and a shelterin protein complex (Gomez et al., 2012). The maintenance of telomeres is essential for cell growth and division, so oncogenesis is dependent on the maintenance of these structures.

The maintenance of telomeres depends on reverse transcriptase activity of Telomerase. Telomerase is a ribonucleoprotein complex with catalytic activity that consists in a catalytic subunit (hTERT) and its own RNA (hTER) which serves as template for the synthesis of telomeric DNA and other accessory components (Heeg, 2015). The cellular immortality is telomerase-dependent in 85% of the tumors. In the remaining 15% the telomeres are maintained by alternative mechanisms. Telomerase is the enzyme responsible for the elongation of telomeres during replication and cell division and, therefore, for the maintenance of telomeres generation to generation.

Due the relationship between the maintenance of telomeres and telomerase in oncogenesis the purpose of this review is to characterize the main structural and functional aspects of the telomeres and telomerase, as well as its role in the maintenance of telomeres, how it's regulated and, above all, their therapeutic application in the treatment of cancer, specially to get more specificity and less toxic therapies.

**Key-words:** telomeres, telomerase, maintenance of telomeres, cellular senescence, oncogenesis.

## **INTRODUÇÃO**

A palavra “cancro” encontra a sua ascendência na palavra grega “karkino”, que significa “caranguejo”. Este termo foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates, o “pai da medicina” em 460–370 a.C, mas as evidências da existência da doença surgiram muito antes dessa data. Em 1600 a.C, no Antigo Egito, surgiram os primeiros manuscritos que revelaram a existência do cancro, sendo que em 1500 a.C, foi considerada uma doença incurável, cujo tratamento se restringia à remoção do tumor e/ou tratamento paliativo. Hoje em dia, o cancro é a segunda causa de morte em todo o mundo, revelando-se um grave problema de saúde pública (Sudhakar, 2009).

Nas últimas décadas do século XX surgiram a quimioterapia e radioterapia que foram bem-sucedidas no tratamento de alguns tipos de cancro. No entanto, este tipo de abordagem acarreta uma série de reações adversas devido à elevada toxicidade que apresentam, tanto para as células malignas como para as células saudáveis (Sudhakar, 2009).

Assim, torna-se importante procurar novas estratégias terapêuticas para o tratamento das doenças malignas, de forma a reduzir a toxicidade e os efeitos secundários das terapêuticas instituídas. Atualmente, são também utilizados métodos de hormonoterapia, em tumores hormono-dependentes e, imunoterapia que se baseia no controlo de fatores de crescimento tumoral (Sudhakar, 2009).

Cabe aos farmacêuticos, juntamente com outros profissionais de saúde/investigadores, trabalhar este tema, com o intuito de alcançar um tratamento cada vez mais eficaz e mais específico. Durante as últimas décadas, estudos acerca do processo de oncogénese abriram novos caminhos na investigação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro. De entre as diferentes evidências observou-se que a manutenção do comprimento dos telómeros desempenhava um papel crucial no desenvolvimento de imortalidade nas células cancerígenas, que é garantida por uma enzima específica designada por telomerase.

A descoberta de como os telómeros e a telomerase protegem os cromossomas, que valeu a Elizabeth H Blackburn, Jack W Szostak e Carol W Greider o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina de 2009 (The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 2009), e a descoberta de moléculas que interfiram com essas estruturas, são hoje um grande desafio para a obtenção de terapias eficazes e com efeitos tóxicos toleráveis.

Assim, este trabalho tem como objetivo resumir e clarificar a base e conclusões desses estudos, desde a estrutura e função dos telómeros e da telomerase e o seu papel na



cromossoma contra a ativação dos mecanismos de reparação do DNA. Esta proteção é crucial para a manutenção da integridade genética, uma vez que a extremidade dos telómeros se assemelha a uma rutura na cadeia de DNA (Gomez et al., 2012).

A estrutura *T-loop* forma-se através da invasão da cadeia-G sobre a região de cadeia dupla de DNA dando origem a um círculo estabilizado pelas proteínas “shelterinas” (Figura I). A formação destas estruturas influencia a replicação do DNA e a alongação dos telómeros, uma vez que interferem com a disponibilidade da extremidade do cromossoma para a maquinaria replicativa da célula (Gomez et al., 2012).

Os telómeros formam ainda uma estrutura denominada por *D-loop* (ou laço de deslocamento). Esta forma-se quando o terminal da estrutura *T-loop* destabiliza a cadeia dupla de DNA e forma pares de bases com uma das cadeias simples (Figura I) (Gomez et al., 2012).

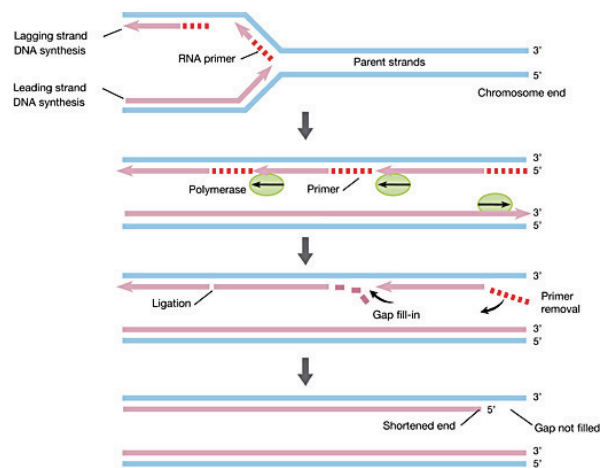
A extremidade-3' da cadeia-G permite a formação de uma terceira estrutura complexa, igualmente com grande relevância na função protetora dos telómeros (Heeg, 2015). Este complexo, designado por *G-quadruplex*, é constituído por nucleótidos de G empilhados na forma de quartetos, que podem assumir diferentes conformações (Gomez et al., 2012). A estrutura *G-quadruplex* regula a atividade catalítica da telomerase, protegendo os telómeros da ligação da enzima e dos mecanismos de sinalização de reparação do DNA (Heeg, 2015).

## **1.2 Manutenção dos telómeros**

A manutenção dos telómeros é fundamental para garantir a transmissão contínua e íntegra da informação genética ao longo dos vários ciclos de divisão celular. Nas células eucarióticas, a replicação do DNA envolve um conjunto de enzimas entre as quais se destaca a DNA-polimerase, que sintetiza cadeias de DNA a partir das cadeias de DNA molde e um *primer*, a sequência iniciadora da replicação (Figura 2).

A DNA-polimerase é unidirecional, isto é, a adição dos nucleótidos pela enzima ocorre somente na direção 5'-3'. Assim sendo, enquanto uma das cadeias simples da dupla hélice é replicada de forma contínua - Cadeia *leading* -, a replicação da cadeia complementar é descontínua – Cadeia *lagging* (Figura 2) (Gomez et al., 2012).

A replicação do DNA foi objeto de estudo durante vários anos, sendo que foram descobertas certas particularidades que caracterizam as estruturas protetoras dos cromossomas. Uma delas é o facto de a DNA-polimerase não ser capaz de copiar todo o comprimento do cromossoma de forma linear (Greider and Blackburn, 2009). Isto é, no final da replicação, a DNA-polimerase não consegue replicar toda a cadeia *lagging* após a



**Figura 2** – Representação esquemática do “problema do final da replicação” dos telómeros. Na replicação dos telómeros estão envolvidos a DNA-polimerase (verde) e os primers (vermelho). Representação esquemática das cadeias *leading* (superior), cuja replicação é contínua, e *lagging* (inferior), replicada de forma descontínua. A remoção do *primer* após a replicação descontínua da cadeia *lagging*, deixa uma porção do DNA telomérico por replicar (The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 2009).

remoção do *primer* (Figura 2) (Gomez et al., 2012). Assim, surge o “problema do final da replicação” que teoricamente levaria a que uma parte do cromossoma, nomeadamente a porção final dos telómeros, ficasse por replicar. A cada divisão do ciclo celular os telómeros ficariam cada vez mais curtos, levando à perda de informação genética ao longo das gerações (Greider and Blackburn, 2009).

Perante este problema, há necessidade da existência de um mecanismo celular que garanta a transmissão íntegra da informação genética (Osterhage and Friedman, 2009). Alguns investigadores aperceberam-se de que os telómeros encurtavam durante a divisão celular, no entanto, também alongavam devido à atividade de uma enzima que não a DNA-polimerase. Mais tarde, surgiram evidências de que a alongação dos telómeros consistia na adição de subunidades teloméricas recém-sintetizadas por outra enzima - a Telomerase (Greider and Blackburn, 2009).

O processo de manutenção dos telómeros ocorre tanto em células normais como em células tumorais. Sabe-se que a capacidade de divisão das células malignas depende da manutenção da estabilidade dos cromossomas durante a replicação e, portanto, da estabilidade dos telómeros. Em 85% dos tumores, a manutenção dos telómeros é garantida pela telomerase. Os restantes 15% que não expressam a telomerase mantêm os telómeros através de um mecanismo alternativo de alongamento dos telómeros (ALT) (Heeg, 2015). Sabe-se que 100% dos adenocarcinomas expressam a telomerase e que o ALT ocorre essencialmente em sarcomas. A razão para esta diferença na expressão da telomerase em

função do tipo de tecido não é ainda conhecida (Wojtyla et al, 2011). Surgiram evidências de que os dois mecanismos podem ocorrer em simultâneo no mesmo tumor ou na mesma célula, mas o mecanismo de manutenção dos telómeros através do ALT permanece ainda desconhecido (Heeg, 2015). Esta revisão foca-se na manutenção dos telómeros dependente da telomerase.

Outro problema que ameaça a manutenção dos telómeros é a semelhança dos terminais dos cromossomas a um corte na cadeia de DNA que, teoricamente, levaria à ativação de mecanismos de reparação de DNA. A presença do complexo proteico “shelterina”, que liga especificamente ao terminal dos cromossomas, impede o reconhecimento dos locais de DNA danificados, pelas respetivas proteínas de sinalização dos mecanismos de reparação do DNA (Palm and Lange, 2009).

Nos tumores cuja elongação dos telómeros é regulada pela telomerase, torna-se importante perceber como é regulada a atividade da enzima, desde a transcrição génica ao seu recrutamento para os telómeros (Osterhage and Friedman, 2009).

## **2 A TELOMERASE**

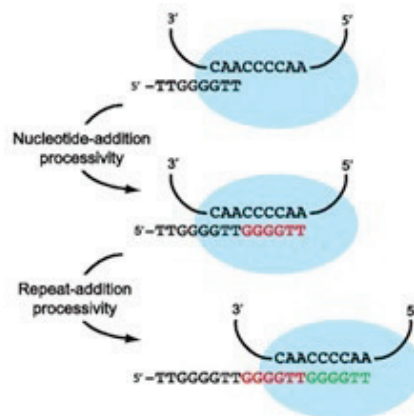
### **2.1 Estrutura e função**

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico com atividade catalítica, mais especificamente, uma transcriptase reversa (RT), constituída por uma subunidade catalítica (hTERT) e pelo seu próprio RNA (hTER). O hTER serve como molde para a síntese de DNA telomérico, bem como de outros componentes acessórios (Heeg, 2015). A enzima foi descoberta e caracterizada em 1980 e demonstrou desempenhar um papel fundamental na elongação dos telómeros, contribuindo para a manutenção das estruturas protetoras dos terminais dos cromossomas (Osterhage and Friedman, 2009).

O local ativo da telomerase apresenta grande homologia com outras RT. Contém uma tríade de resíduos de ácido aspártico, essenciais para a atividade catalítica da enzima (Osterhage and Friedman, 2009).

A região C-terminal da telomerase parece estar envolvida na manutenção dos telómeros, uma vez que mutações no terminal levam à supressão da atividade catalítica da enzima. A sequenciação de genes permitiu identificar diferentes regiões que definem uma maior ou menor afinidade para a ligação ao DNA telomérico. A região N-terminal tem baixa afinidade para a ligação aos telómeros, mas poderá funcionar como elo de ligação de outros componentes proteicos que facilitam a ligação da telomerase e regulam a processabilidade da enzima (Figura 3) (Osterhage and Friedman, 2009).

As características da telomerase podem diferir de espécie para espécie, sendo que cada uma sintetiza uma sequência específica a partir do RNA molde (Greider and Blackburn, 2009). Uma vez possuindo atividade transcriptase reversa, a telomerase é capaz de adicionar nucleótidos ao terminal do cromossoma a partir da transcrição do hTER (Figura 3). Este procedimento apenas é possível devido à complementaridade de bases entre o DNA telomérico e o RNA da telomerase. A elongação dos telómeros consiste, então, na repetição deste processo, completando-se ciclos de alinhamento e extensão, sendo que a primeira extensão designa-se por processibilidade de adição de nucleótidos e a segunda extensão por processibilidade de adição repetida (Figura 3) (Osterhage and Friedman, 2009). Assim, a manutenção da integridade da informação genética após cada ciclo celular é garantida pela ação da telomerase. A importância deste mecanismo na manutenção do comprimento dos telómeros nas células cancerígenas é descrita posteriormente.



**Figura 3** – Representação do mecanismo de ação da telomerase (azul). A complementaridade de bases entre o DNA telomérico e o hTER permite a alocação da extremidade-3' no local ativo da telomerase; através da transcrição reversa, a telomerase realiza a primeira extensão – processibilidade de adição de nucleótidos (vermelho); a processibilidade de adição repetitiva permite a segunda adição de nucleótidos (verde) à cadeia telomérica e, portanto a elongação dos telómeros (Osterhage and Friedman, 2009).

### 3 TELOMERASE, SENESCÊNCIA CELULAR E O CANCRO

A presença da telomerase em células cancerígenas foi descoberta pela primeira vez em 1989, por Gregg B. Morin. Atualmente sabe-se que a telomerase é produzida precocemente por todas as células nucleadas e a sua presença é fundamental para manter as células imortais (Greider and Blackburn, 2009).

Estudos realizados em fibroblastos mostraram que a ausência da telomerase leva ao encurtamento dos telómeros, de forma diretamente proporcional ao aumento do número de divisões celulares. Diferentes trabalhos têm demonstrado que, ao fim de determinado número de ciclos celulares, o encurtamento dos telómeros poderia explicar o mecanismo de senescência celular que leva à perda da função e morte das células (Gomez et al., 2012). O mecanismo de senescência celular baseia-se na “contagem” do número de ciclos celulares através do número de repetições teloméricas que as células vão perdendo ciclo após ciclo, e ocorre quando os telómeros atingem determinado comprimento crítico (Greider and Blackburn, 2009). Isto é, quando atingem o comprimento telomérico crítico, as células desencadeiam a ativação de vias de resposta ao dano no DNA, levando à saída das células do ciclo celular e à senescência.

Assim, na ausência da telomerase, os telómeros funcionam como um “relógio” que determina o tempo de vida das células e o envelhecimento humano. Contudo, diferentes investigadores defendem que o encurtamento dos telómeros e a capacidade proliferativa poderá estar na origem do envelhecimento humano mas não será a sua principal causa (Greider and Blackburn, 2009).

O ponto fundamental deste tema é a capacidade da telomerase interferir com a dinâmica telomérica e a imortalização celular. Bodnar *et al* (1996) demonstraram que a reintrodução da hTERT nos fibroblastos humanos levava à alongação dos telómeros e, conseqüentemente, a um incremento do tempo de vida replicativa das células (Gomez et al., 2012).

A envolvimento da telomerase no desenvolvimento de cancro começou a ser estudada em 1990. O cancro caracteriza-se pela divisão contínua e descontrolada de células, que adquirem múltiplas mutações que lhes conferem a capacidade de “escapar” aos mecanismos de reparação e apoptose celulares. Teoricamente, a ausência da telomerase contraria o desenvolvimento do cancro, por promover a perda de sequências teloméricas e a posterior morte celular. Na realidade, acontece que numa grande maioria de tumores, as células cancerígenas são capazes de sintetizar a enzima (Greider and Blackburn, 2009).

A presença da telomerase foi avaliada em múltiplas linhagens de células cancerígenas, sendo que 90 de 101 amostras eram telomerase-positivas. As células cancerígenas em estudo representavam 12 tipos de cancro. Por outro lado, em nenhuma das 50 linhagens de células somáticas não-cancerígenas se detetou a presença da telomerase (Greider and Blackburn, 2009).

Observou-se também que os telómeros das células tumorais apresentam um tamanho inferior aos telómeros das células normais. Uma possível explicação para este



fenómeno surgiu através de estudos realizados com células humanas normais, nas quais se inibiram os mecanismos de “alarme”, que desencadeiam a apoptose celular após os telómeros atingirem o comprimento crítico (Greider and Blackburn, 2009).

As células em que os mecanismos de sinalização estavam inibidos, continuaram a proliferar para além do que era suposto se os mecanismos de apoptose estivessem ativos e a grande maioria não apresentava a telomerase, observando-se um encurtamento drástico dos telómeros. Todavia, uma porção das mesmas células continuou a proliferar, adquirindo imortalidade. As células imortais apresentavam telómeros curtos e a telomerase ativa. Assim, foi sugerido que a telomerase poderia tornar-se ativa após os mecanismos de controlo da replicação celular estarem comprometidos. (Greider and Blackburn, 2009).

A ativação da telomerase, após o início da replicação descontrolada das células, leva a que os telómeros apresentem um comprimento inferior nas células tumorais relativamente às células normais, uma vez que no momento em que a enzima é ativada, os telómeros já terão perdido parte das repetições teloméricas (Greider and Blackburn, 2009).

Estas evidências levaram à criação da hipótese telomérica da senescência e imortalização celular que descreve a relação entre a manutenção dos telómeros e a imortalização (Figura 4) (Gomez et al., 2012).

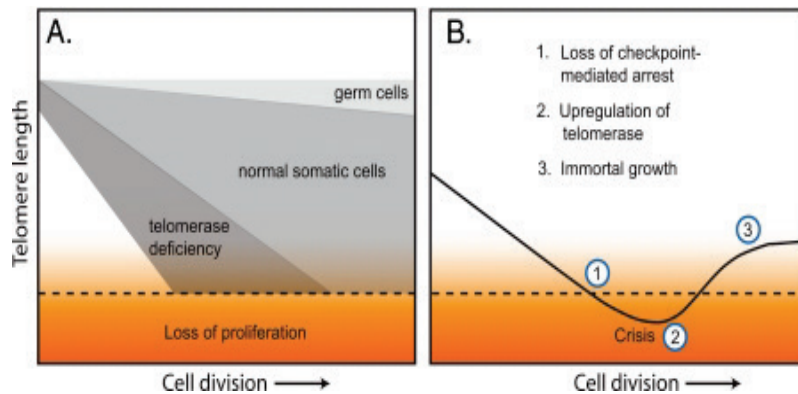
Este modelo hipotético baseia-se no facto de a telomerase ser maioritariamente sintetizada pelas células germinativas, durante o desenvolvimento embrionário. Quando o organismo se encontra completo, muitas das células somáticas deixam de produzir a enzima e, conseqüentemente, perdem a capacidade proliferativa, quando os telómeros atingem o comprimento crítico, por ativação dos mecanismos de repouso/apoptose (Figura 4, A) (Greider and Blackburn, 2009).

Normalmente, a inibição do ciclo celular é mantida por meio da ativação de vias de sinalização celulares como, por exemplo, as vias mediadas pela proteína p53. Contudo, estes mecanismos podem ser interrompidos por diversos fatores, como por ação de vírus ou mutações, que tornam as células incapazes de ativar os mecanismos de senescência celular. A hipótese da senescência e imortalização celular atribuiu a este ponto a denominação de “pré-crise”, que se caracteriza pela divisão celular além do limite replicativo (Figura 4, B1) (Gomez et al., 2012).

Ora, a permanência no estado proliferativo leva à perda de sequências teloméricas a cada ciclo celular e, conseqüentemente, ao encurtamento dos telómeros. Assim, no período de pré-crise, as células podem seguir duas vias: morte por perda completa dos telómeros ou ativação da telomerase (Greider and Blackburn, 2009). A ativação da telomerase dá origem ao período de “crise”, no qual a enzima permite a manutenção das sequências teloméricas

remanescentes (Figura IV, B2.). A manutenção dos telómeros pela enzima é o fator determinante para proliferação descontrolada das células e imortalidade, característica do cancro (Greider and Blackburn, 2009).

A presença da telomerase nas linhas celulares de 85 a 90% dos tumores humanos apoia a hipótese da senescência e imortalidade celular. A ativação da telomerase após a



**Figura 4** – A. As células germinativas têm elevada capacidade proliferativa. Na maioria das células somáticas à medida que se dividem vão perdendo sequências teloméricas, o que leva à morte celular assim que seja atingido o comprimento telomérico crítico. Quando a atividade da telomerase está comprometida ou ausente, a perda das sequências teloméricas ocorre mais rapidamente. B. Ativação da telomerase durante a oncogénese. Quando as células atingem o limiar para o qual o comprimento dos telómeros é insuficiente para a sobrevivência celular as células continuam a dividir-se (1). As células acumulam mutações que causam instabilidade genómica - “crise” (2). A ativação dos mecanismos de manutenção dos telómeros (telomerase e ALT) permite que as células ultrapassem o período “crise” e continuem a proliferar (Osterhage and Friedman, 2009).

perda dos mecanismos de sinalização celular explica o facto de as células malignas apresentarem telómeros de tamanho inferior ao das células normais. Estudos realizados com indivíduos portadores de cancro permitiram verificar que grande número de metástases é antecedido de um período de dormência, o que reforça a hipótese telomérica da senescência e imortalização celular (Gomez et al., 2012).

Assim, podemos afirmar que os telómeros serão responsáveis pela senescência celular e a sua manutenção será o ponto fulcral no desenvolvimento de tumores. A expressão da telomerase mostrou ser suficiente para induzir a imortalidade nas células e, por isso, torna-se importante perceber os mecanismos que regulam a atividade da enzima, de modo a aplicar os conhecimentos no desenvolvimento de novas soluções terapêuticas para o tratamento do cancro (Gomez et al., 2012).

#### 4 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE

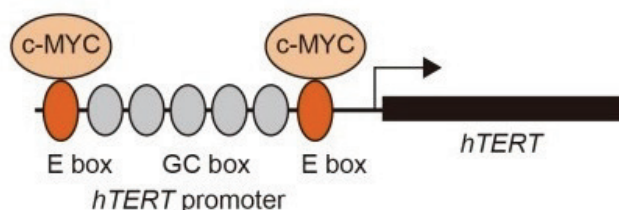
A presença da telomerase em células de diferentes tipos de cancro e a sua ausência na maioria das células normais despertou o interesse na utilização da enzima como um

possível alvo terapêutico de fármacos antitumorais. O desenvolvimento destes fármacos requer um conhecimento profundo dos mecanismos de regulação responsáveis pela ativação da telomerase e carcinogénese (Greider and Blackburn, 2009).

A manutenção dos telómeros é regulada por uma série de mecanismos envolvendo a regulação transcricional da hTERT, regulação pós-transcricional e regulação do recrutamento da telomerase através das proteínas ligantes dos telómeros e fatores acessórios às “shelterinas” (Osterhage and Friedman, 2009).

#### 4.1 Regulação da transcrição da hTERT

A regulação da transcrição da hTERT é o principal mecanismo de regulação da atividade catalítica da telomerase (Heeg, 2015). Foi demonstrado que a expressão da subunidade catalítica é muito reduzida ou ausente na grande maioria das células somáticas. No entanto, a quantidade de enzima expressa durante o desenvolvimento embrionário, em algumas células-tronco e na maioria dos tumores sugere que a expressão da telomerase está diretamente relacionada com a capacidade de divisão e proliferação das células (Osterhage and Friedman, 2009).



**Figura 5** – Representação esquemática do gene codificante da hTERT. A ativação do promotor promove a transcrição do gene. Este é constituído por E-boxes (laranja) e GC-boxes (azul), que ligam fatores de transcrição (Sp1 e Myc) (Yamashita et al., 2014).

A transcrição do gene que codifica para a subunidade catalítica mostrou ser dependente da região proximal do promotor. O promotor é constituído por E-boxes e GC-boxes, que constituem locais de ligação de fatores de transcrição, e cuja ativação é crucial para a imortalização celular e carcinogénese (Figura 5) (Kyo et al., 2000).

Certas vias de sinalização celular e mecanismos regulados por fatores de transcrição mostraram estar envolvidos na regulação da transcrição de hTERT. As vias de sinalização PI3K/Akt (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato cinase/Proteína cinase B) e MAPK (proteína cinase ativada por mitogénio) induzem a expressão da hTERT, levando à proliferação, sobrevivência e angiogénese (Heeg, 2015).

Vários estudos permitiram ainda identificar os fatores de transcrição Sp1 e Myc, que ligam ao promotor de hTERT, ativando a transcrição do gene que codifica para a subunidade catalítica (Heeg, 2015). Os fatores Sp1 e Myc ligam aos locais *GP-boxes* e *E-boxes*, respetivamente (Figura V). Sabe-se ainda que a proteína Myc atua em conjunto com a proteína Max, formando o heterodímero Myc/Max responsável pela indução da transcrição de hTERT. Por outro lado, fatores como a proteína Mad em associação com a Max, suprimem a transcrição de hTERT mediante a ligação às *E-boxes* (Kyo et al., 2000).

A inibição de fatores indutores da transcrição, poderá constituir um ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos inibidores da expressão de hTERT e, consequentemente, da atividade da telomerase.

#### **4.2 Regulação pós-transcrição de hTERT**

As modificações pós-transcrição também participam na regulação da atividade da telomerase. O *splicing* alternativo do mRNA é um dos mecanismos que controla a expressão do gene de hTERT, que resulta em diferentes variantes do gene. Estas variantes são observadas principalmente nos testículos e cólon, o que sugere grande regulação do gene durante a fase de desenvolvimento (Wojtyla et al, 2011).

A regulação pós-transcrição pode também ocorrer através da fosforilação reversível de resíduos de serina/treonina ou tirosina da hTERT (Heeg, 2015) que poderá afetar a estrutura, localização e atividade da enzima (Wojtyla et al, 2011).

#### **4.3 Regulação do recrutamento da telomerase**

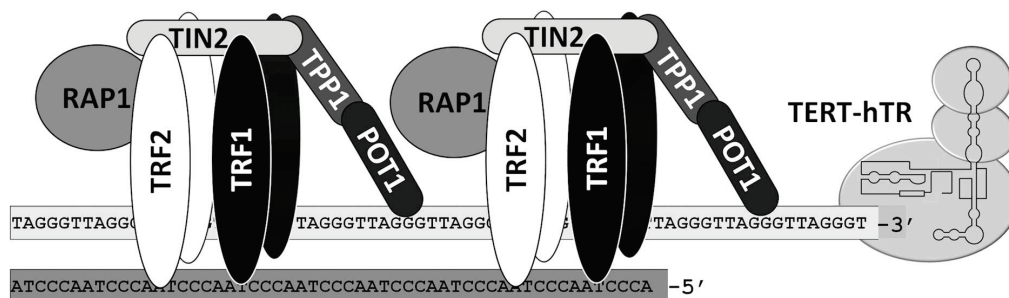
O recrutamento da telomerase à extremidade terminal dos cromossomas é regulado por vários fatores. Sabe-se que o ciclo celular tem influência no recrutamento, sendo que é na fase S que se deteta maior atividade da telomerase (Osterhage and Friedman, 2009). Contudo, o complexo “shelterina” e os fatores a elas associados parecem assumir o papel principal no que diz respeito à regulação do recrutamento da enzima.

##### **4.3.1 Complexo “shelterina”**

Nos humanos, a estrutura *T-loop* é estabilizada por um conjunto de proteínas especializadas que constituem o complexo “shelterina”. As proteínas “shelterinas” ligam-se aos telómeros por reconhecimento das sequências repetitivas TTAGGG do DNA telomérico e têm como principal função estabilizar a estrutura *T-loop*, protegendo-os contra os mecanismos de reparação do DNA (Gomez et al., 2012).

As principais “shelterinas” descritas são as proteínas TRF1 (*Telomeric repeat binding factor 1*), TRF2 (*Telomeric repeat binding factor 2*) e POT1 (*Protection of telomeres protein 1*) que interagem diretamente com o telómero bem como, as proteínas TIN2 (*TRF1 interacting nuclear protein 2*), Rap1 (*Repressor/activator protein 1*) e TPPI (*Tripeptidyl-peptidase 1*) a elas associadas (Figura 6) (Osterhage and Friedman, 2009).

As proteínas TRF1 e TRF2 são as “shelterinas” humanas melhor conhecidas. A TRF1 foi a primeira “shelterina” a ser descoberta e liga-se ao DNA telomérico, por reconhecimento da sequência TTAGGG (Figura 6) (Gomez et al., 2012).



**Figura 6** – Representação da associação do complexo “shelterina” ao telómero. As proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se à cadeia de DNA telomérica por reconhecimento da sequência TTAGGG. A ligação da proteína POT1 ao telómero depende da atividade da proteína TPPI. A Rap1 forma um complexo com a proteína TRF2, participando na proteção dos telómeros contra os mecanismos de reparação do DNA. A proteína TIN2 está associada a ambas as proteínas TRF1 e TRF2, e parece intervir na atividade das mesmas (Gomez et al., 2012).

A proteína TRF2 reconhece a mesma sequência telomérica e também desempenha um papel importante na estabilização da estrutura *T-loop*. A sua principal função é proteger os telómeros, impedindo os mecanismos de reparação do DNA (Gomez et al., 2012).

Na atividade das “shelterinas” estão envolvidas duas proteínas cinases – a ATM (Proteína ataxia-telangiectasia mutada) e a ATR (Proteína ataxia-telangiectasia relacionada com Rad3), envolvidas nas vias de sinalização celulares de reparação do DNA (Janoušková et al., 2015). Estas proteínas cinases localizam-se no topo das cascatas de sinalização e funcionam como sensores do dano no DNA que fosforilam e ativam outras proteínas, essenciais para a reparação das cadeias de DNA. Sabe-se ainda que as duas vias podem cruzar-se, uma vez que a proteína ATM consegue ativar elementos da cascata mediada pela ATR (Janoušková et al., 2015).

A ativação destas vias de sinalização leva à quebra do ciclo celular, colocando a célula em repouso ou desencadeando a morte celular programada/apoptose. O resultado depende das proteínas fosforiladas pelas ATM e ATR, sendo que a fosforilação da Chk1 (*Serine/threonine-protein kinase 1 / Checkpoint kinase 1*) leva à saída das células do ciclo celular

e a fosforilação da ChK2 (*Serine/threonine-protein kinase 2/ Checkpoint kinase 2*) está maioritariamente associada a apoptose. A proteína TRF2 está envolvida na supressão da via de reparação mediada pela ATM (Lin et al., 2010).

Da mesma forma, a TRF2 mostrou inibir a ação do heterodímero Ku70/80 e a proteína Ligase 4, componentes necessários na reparação do DNA por recombinação, evidenciando a função protetora da proteína (Janoušková et al., 2015).

A proteína Rap1 forma um complexo com a TRF2 (Figura VI) (Gomez et al., 2012). Estudos desenvolvidos com intuito de perceber o impacto da Rap1 na ligação da TRF2 ao DNA do telómero, demonstraram que a Rap1 induz a libertação parcial da TRF2 da dupla cadeia de DNA. A proteína Rap1 poderá então participar na regulação positiva do comprimento dos telómeros, por facilitar o acesso da enzima aos telómeros aquando da remoção da proteína TRF2 (Janoušková et al., 2015).

A proteína POT1 é também responsável pela proteção e regulação do comprimento dos telómeros e a sua função é dependente da proteína TPPI. Os heterodímeros POT1-TPPI formam múltiplas ligações com o DNA telomérico, dando origem a aglomerados proteicos que protegem os telómeros da degradação, recombinação e dos mecanismos de reparação do DNA (Corriveau et al., 2013). Estudos demonstraram que, na ausência destas proteínas, a cadeia G adquire a estrutura *G-quadruplex*. Quando o complexo POT1/TPPI está presente, este liga-se ao telómero, promovendo a conformação relaxada da estrutura *G-quadruplex* e, conseqüentemente, permitindo o recrutamento da telomerase para o telómero. A ligação do complexo POT1/TPPI facilita, então, a ligação da telomerase ao telómero, alterando a estrutura *G-quadruplex* para uma estrutura mais acessível à enzima responsável pela elongação dos telómeros (Corriveau et al., 2013). No entanto, a função do complexo POT1-TPPI tem demonstrado ser bastante complexa porque parece aumentar a processabilidade da telomerase, mas também é capaz de inibir o acesso da telomerase aos telómeros em certas condições (Wojtyla et al, 2011).

A proteína TIN2 é codificada pelo gene TIN2, constituído por 9 exões que dão origem a diferentes isoformas da proteína. Foi demonstrado que a deleção da TIN2 leva à ativação da via de sinalização mediada pela ATR, à indução da via mediada pela ATM e provoca um aumento das fusões inter-cromossomas. Isto é, a TIN2 participa na inibição das vias de reparação mediadas pelas proteínas ATM e ATR, tal como a proteína TRF2.

A sobreexpressão da TRF2 demonstrou que a proteína, por si só, não tem capacidade para suprimir completamente a via de sinalização mediada pela ATM, sugerindo que a TIN2 poderá estar envolvida na atividade da proteína TRF2 (Frescas and Lange, 2014). Sabe-se ainda que a deleção das proteínas TRF1 e TRF2 leva a uma diminuição da quantidade de

proteínas POT1 associadas aos telómeros (Frescas and Lange, 2014). Assim, tem sido sugerido que TIN2 poderá influenciar a função da proteína TRF2 e, conseqüentemente, a atividade da proteína POT1 nos telómeros.

Desta forma, tem sido demonstrado que as proteínas “shelterinas” desempenham um papel importante na atividade da telomerase na manutenção do comprimento dos telómeros, tanto negativa como positivamente, por permitirem ou não o acesso da telomerase às estruturas cromossómicas. Contudo, dada a complexidade destas interações, ainda existem muitos aspetos por esclarecer. Um deles é a influência de fatores associados às “shelterinas” na atividade das proteínas. De seguida são apresentados os fatores acessórios às “shelterinas” que, ao interferirem com este complexo, poderão regular a atividade da telomerase e a alongação dos telómeros.

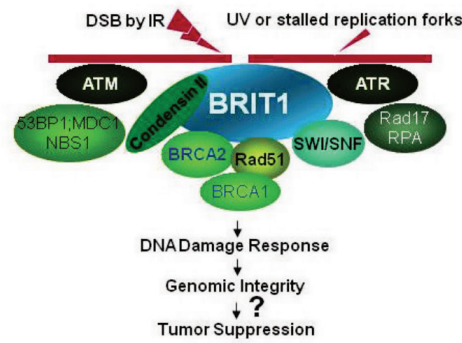
#### **4.3.2 Fatores acessórios às “shelterinas”**

A atividade das “shelterinas” depende do reconhecimento das sequências teloméricas repetitivas, da interação entre si e do recrutamento de fatores acessórios (Gomez et al., 2012).

Associada a TRF1 encontram-se enzimas teloméricas pertencentes à família das polimerases poli(ADP-ribose) (PARP), compostas por quatro domínios. As PARP englobam um conjunto de 17 proteínas, mas são as PARP-1, PARP-2, tanquirase-1, tanquirase-2 e as vPARP que parecem estar envolvidas nos mecanismos de reparação do DNA, uma vez que danos na cadeia simples de DNA desencadeiam a ativação das enzimas (Davar et al., 2012).

Os fatores acessórios à TRF2 melhor conhecidos são a proteína BRIT1/MCPH1 (*Microcephalin 1*) e o complexo ERCC1-XPF. A proteína BRIT1 intervém na regulação do comprimento dos telómeros (Lin et al., 2010) e é constituída por três domínios BRCT. Os domínios BRCA1 e BRCA2 ligam especificamente a proteínas fosforiladas envolvidas na ativação de mecanismos de reparação do DNA mediados pelas vias ATM e ATR (Figura 7) (Gomez et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado que, em alguns tipos de cancro, nomeadamente no carcinoma da mama e ovários, a quantidade de BRIT1 é menor comparativamente às células não-cancerígenas. De 54 linhas de células em estudo, 72% mostraram um decréscimo na expressão do gene que codifica para a proteína, o que sugere que a ausência da proteína está relacionada com uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro (Lin et al., 2010). Além disso, o aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro por deficiência de BRIT1, mostrou ser dependente da proteína p53. A p53 está envolvida nas vias de sinalização celular, mais precisamente, na morte celular programada. As células BCRA-



**Figura 7** – Proteína BRIT1 na resposta ao dano no DNA. Os danos na dupla cadeia de DNA e no garfo de replicação levam à ativação das vias de reparação de DNA ATM e ATR. A BRIT1 participa nessas vias e parece ser crucial para a reparação do DNA, manutenção da integridade genómica e, portanto, na supressão tumoral (Lin et al., 2010).

deficientes caracterizam-se por apresentarem deficientes mecanismos de reparação, nomeadamente na via de reparação por recombinação homóloga (HR). No entanto, a deficiência em BRIT1, por si só, não aumenta a suscetibilidade para o cancro. A suscetibilidade aumenta quando as células carecem de ambas as proteínas (Lin et al., 2010).

A proteína ERCCI (*Excision repair cross-complementation group 1*) é uma proteína de reparação do DNA que, em conjunto com a proteína ERCC4 (XPF), forma o complexo ERCCI-XPF com atividade endonuclease. O complexo está envolvido nos mecanismos de reparação por excisão de nucleotídeos (NER), e tem sido estudada a sua importância na prevenção do cancro e na resistência aos fármacos anticancerígenos. A elevada expressão de ERCCI tem sido associada à resistência a tratamentos quimioterápicos em alguns tipos de cancro (McNeil and Melton, 2012).

Envolvidos na atividade das “shelterinas” estão ainda os fatores descritos na Tabela I, cuja função e influência na manutenção dos telómeros ainda não está completamente esclarecida.

**Tabela I** – Breve descrição dos fatores acessórios às “shelterinas” (Gomez et al., 2012).

PINX1	Interfere com a proteína TRF1.
Apollo	Exonuclease envolvida na reparação do DNA. O seu recrutamento para os telómeros é modulado pela TRF2.
Complexo MRN	Envolvido nos mecanismos de reparação do DNA. A sua função é também mediada pela TRF2.
PNUTS ( <i>Phosphatase nuclear targeting subunit</i> )	A sua ativação induz a apoptose mediante a danificação das cadeias de DNA.
WRN ( <i>Werner syndrome RecQ like helicase</i> )	Mutações no gene que codificam para a proteína estão associadas ao Síndrome de Werner, caracterizado por senescência células prematura.



Complexo ORC ( <i>Origin recognition complex</i> )	Parece estar implicado na replicação dos cromossomas, por reconhecimento da sequência iniciadora da replicação.
--	---

Todos estes dados surgiram ao longo de vários anos de investigação e são fundamentais para compreender a ligação entre as “shelterinas”, os fatores acessórios e a atividade da telomerase na manutenção dos telómeros. A continuidade de pesquisas nesta área poderá ser o ponto de partida para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra o cancro.

## 5 APLICAÇÃO TERAPÊUTICA NO CANCRO

Atualmente, a terapêutica anticancerígena é baseada, na sua maioria, em fármacos que apresentam elevada toxicidade, por falta de seletividade para as células malignas. O facto de a maioria das células somáticas normais não expressarem a telomerase, poderá permitir a criação de novas estratégias terapêuticas mais seletivas e, portanto, menos tóxicas, baseadas em inibidores da atividade da telomerase. Tem sido demonstrado que a inibição da telomerase evita a proliferação descontrolada das células malignas ou induz a apoptose, sem interferir com as células saudáveis (Chen et al., 2009).

Alguns fármacos antirretrovirais como a zidovudina (AZT), análogo dos nucleósidos, são efetivos na inibição da telomerase. Contudo, esta alternativa terapêutica carece da seletividade das possibilidades que têm vindo a ser estudadas (Andrews and Tollefsbol, 2009).

A investigação e desenvolvimento têm tido como foco tanto a hTERT e o RNA hTER, como as proteínas envolvidas na regulação da elongação dos telómeros e os fatores a elas associados. A hTERT tem despertado grande interesse na medida em que mostrou ser importante para a atividade da enzima e se encontra presente em concentrações elevadas nas células cancerígenas, ao contrário do que se verifica nas células normais (Andrews and Tollefsbol, 2009).

Com o intuito de inibir a expressão de hTERT, foram realizados ensaios com oligodesoxiribonucleótidos *antisense* e moléculas de siRNA (*small-interfering RNA*), capazes de ligar a sequências específicas de mRNA (RNA mensageiro). Ambas as estratégias mostraram ser eficazes na inibição da atividade da telomerase (Andrews and Tollefsbol, 2009).

A mesma estratégia foi testada na inibição de hTER. O sistema oligoadenilato *antisense* (2-5A) mostrou ser efetivo na inibição de hTER, por um mecanismo de ativação de

RNases, que clivam o hTER, reduzindo ou eliminando por completo a atividade da telomerase (Andrews and Tollefsbol, 2009).

Outra tentativa de inibir a expressão de hTERT foi a utilização de RNA de cadeia dupla (dsRNA) capaz de desencadear uma resposta RNAi (RNA interferência), levando à destruição do mRNA alvo. Contudo, este procedimento não permitiu obter resultados positivos a longo prazo na inibição da expressão de hTERT, devido à degradação da dsRNA pelas células (Andrews and Tollefsbol, 2009).

A utilização de ribozimas e RNAi mostrou eficácia na inibição do hTER, por degradação do RNA molde da telomerase, com redução imediata do crescimento das células cancerígenas. A vantagem desta técnica relativamente às anteriores é o facto de a inibição da atividade da enzima ser independente do comprimento dos telómeros reduzindo, assim, o tempo que é necessário para que ocorra a inibição da proliferação celular (Andrews and Tollefsbol, 2009).

Como alternativa à terapia génica foi estudada a utilização de plasmídeos com genes que codificam para sequências de RNA complementares ao transcrito de hTERT, com base em vetores virais. Esta estratégia demonstrou ser eficaz na inibição da subunidade a longo prazo (Andrews and Tollefsbol, 2009).

Recentemente realizaram-se estudos com moléculas sintéticas, inibidores da transcriptase reversa, não-análogas dos nucleósidos, cujos resultados foram promissores. Um exemplo é BIBR1532 que inibe a hTERT através de um mecanismo que depende da concentração de telomerase, efeito que poderá ser eficaz contra células cancerígenas e não contra as células normais (Andrews and Tollefsbol, 2009).

A proteína MAPK participa na regulação da expressão da hTERT, permitindo a proliferação e sobrevivência das células. A inibição da cinase seria uma abordagem interessante no combate ao cancro, por diminuição da expressão da subunidade da telomerase e consequente inibição da proliferação celular (Andrews and Tollefsbol, 2009).

Adicionalmente, a imunoterapia também tem vindo a demonstrar resultados promissores na eliminação de células cancerígenas telomerase-positivas. As técnicas imunoterápicas utilizam peptídeos derivados da hTERT que desencadeiam uma resposta imune mediada pelos linfócitos T citotóxicos. Os peptídeos são apresentados aos linfócitos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), levando à lise das células malignas, sem toxicidade para as células normais (Andrews and Tollefsbol, 2009).

As proteínas associadas aos telómeros têm sido igualmente objetos de estudo nesta área. Com o desenvolver da investigação acerca das PARP e da sua atividade, foram sintetizadas moléculas capazes de inibir estas enzimas – iPARP (inibidores das PARP). As

PARP funcionam como sensores dos danos na cadeia simples de DNA, levando à ativação dos mecanismos de reparação celulares (Davar et al., 2012). Os iPARP têm como alvo a via de reparação por excisão de bases (BER). Certas linhas celulares tumorais caracterizam-se por apresentarem deficiências nos mecanismos de reparação do DNA, nomeadamente na HR. Ora, na presença de iPARP as duas vias de reparação ficam comprometidas, levando à morte celular (Livraghi and Garber, 2015).

Os iPARP poderão ser uma estratégia promissora na luta contra o cancro, uma vez que a inibição das enzimas leva ao desenvolvimento de danos irreversíveis e à morte celular (Davar et al., 2012). Estas moléculas são efetivas contra células cancerígenas com deficiência nos mecanismos de reparação do DNA, incluindo as células que carecem de BCRA1 e BCRA2. As células BCRA-deficientes caracterizam-se por apresentarem deficientes mecanismos de reparação, nomeadamente na HR e, por isso, os tumores BCRA-deficientes são extremamente sensíveis aos iPARP (Livraghi and Garber, 2015).

Vários fármacos iPARP encontram-se, atualmente, em desenvolvimento clínico, evidenciando resultados satisfatórios no tratamento do carcinoma do ovário e mama, regularmente associados a mutações nos genes BCRA. A molécula Olaparib, desenvolvida pelo laboratório AstraZeneca, encontra-se em fase III, como adjuvante no tratamento do cancro da mama. Outro exemplo é o Velaparib do laboratório Abbvie, em fase II no tratamento do cancro da mama em combinação com fármacos citotóxicos e, em fase III como neoadjuvante em combinação com carboplatina. Estes fármacos encontram-se também em fase II/III de estudos realizados em monoterapia no tratamento do cancro da mama metastático (Livraghi and Garber, 2015).

Relativamente aos fatores acessórios das “shelterinas”, o complexo ERCCI-XPF tem sido estudado na prevenção do cancro e na resistência aos fármacos anticancerígenos. Envolvido na reparação do DNA por excisão de nucleótidos, o complexo participa na reparação de muitos danos causados pelos fármacos quimioterápicos (cisplatina, por exemplo), levando à resistência às abordagens terapêuticas convencionais. Assim, os inibidores do complexo ERCCI-XPF poderão ser uma boa estratégia na supressão da proliferação celular e na resolução da resistência aos demais tratamentos de quimioterapia (McNeil and Melton, 2012).

## **CONCLUSÃO**

Desde tempos remotos que o cancro preocupa a Humanidade. A preocupação com a saúde humana e a curiosidade intrínseca ao ser humano permitiram a investigação contínua na área até aos dias de hoje.

A investigação sobre a manutenção dos telómeros e a telomerase tem efetuado notáveis avanços na compreensão do envelhecimento humano e o desenvolvimento de tumores.

Atualmente existe uma biblioteca de informação acerca do tema, mas cada descoberta leva a que sejam necessários mais estudos de modo a que se entenda todos os aspetos envolvidos nas novas terapias a desenvolver, assegurando de que os benefícios superam os malefícios.

A interferência na manutenção dos telómeros das células cancerígenas, mediante a inibição da atividade da telomerase ou interferindo na função das “shelterinas”, tem demonstrado grandes benefícios ao nível da redução da toxicidade dos fármacos antitumorais, por melhoria da sua seletividade e especificidade terapêutica.

No futuro, a avaliação da atividade da telomerase em determinadas células poderá representar uma forma de avaliar a predisposição para o cancro e, mais importante, controlar a proliferação celular.

Em conclusão, o estudo da manutenção dos telómeros pela telomerase é um tema com grande aplicabilidade em estudos de investigação e prática clínica que incluem a compreensão do mecanismo oncogénico. É necessário dar continuidade à investigação nesta área, uma vez que existem muitos aspetos estruturais e funcionais dos telómeros, telomerase e shelterinas que ainda não são claros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews LG, Tollefsbol TO. Methods of Telomerase Inhibition. *Methods Mol Biol.* 405, 1-8, 2008.
- Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies Targeting Telomerase Inhibition. *Mol Biotechnol.* 41(2), 194–199, 2009.
- Corriveau M, Mullins MR, Baus D, Harris ME, Taylor DJ. Coordinated Interactions of Multiple POT1/TPPI Proteins with Telomere DNA. *J Biol Chem.* 288(23), 16361–16370, 2013.
- Davar D, Beumer JH, Hamieh L, Tawbi H. Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy. *Curr Med Chem.* 19(23), 3907–3921, 2012.
- Frescas D, Lange T. TRF2 Tethered TIN2 Can Mediate Telomere Protection by TPPI/POT1. *Mol Cell Biol.* 34(7), 1349–1362, 2014.
- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF. Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int J Oncol.* 41(5), 1561–1569, 2012.
- Greider CW, Blackburn EH, 2009. Telomeres, Telomerase and Cancer [Reprint]. <http://www.scientificamerican.com/article/telomeres-telomerase-and/>
- Heeg S. Variations in telomere maintenance and the role of telomerase inhibition in gastrointestinal cancer. *Pharmgenomics Pers Med.* 8, 171–180, 2015.
- Janoušková E, Nečasová I, Pavloušková J, Zimmermann M, Hluchý M, Marini V, Nováková M, Hofr C. Human Rap1 modulates TRF2 attraction to telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* 10, 1093, 2015.
- Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H, Inoue M. Sp1 cooperates with cMyc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*). *Nucleic Acids Res.* 28(3), 669–677, 2000.
- Lange T. How Telomeres Solve the End Protection Problem. *Science* 326(5955), 948, 2009.
- Lin S, Liang Y, Li K. Multiple roles of BRIT1\_MCPHI in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression. *Yonsei Med. J.* 51(3), 295-301, 2010.

Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Medicine* 13,188, 2015.

Martínez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci.* 40, 504-515, 2015.

McNeil EM, Melton DW. DNA repair endonuclease ERCCI–XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 10, 1093, 2012.

Osterhage JL, Friedman KL. Chromosome End Maintenance by Telomerase. *J Biol Chem.* 284(24), 16061–16065, 2009.

Palm W, Lange T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet.* 42, 301–34, 2008.

Smogorzewska A, Steensel BV, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, Lange T. Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20(5), 1659-1668, 2000.

Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther.* 1(2), 1-4, 2009.

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 2009. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/popular-medicineprize2009.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/popular-medicineprize2009.pdf)

Wojtyla A, Gladych M, Rubis B. Human telomerase activity regulation. *Mol Biol Rep.* 38(5), 3339–3349, 2011.

Yamashita S, Ogawa K, Ikei T, Fujiki T, Katakura Y. FOXO3a Potentiates hTERT Gene Expression by Activating cMYC and Extends the Replicative Life-Span of Human Fibroblast. *PLoS One* 9(7), 101864, 2014.