

# **TELOMERASE: FUNÇÕES, BASES GENÉTICAS E MOLECULARES**

## **E SUAS IMPLICAÇÕES NAS NEOPLASIAS**

### ***INTRODUÇÃO***

Os avanços científicos alcançados pela genética nos últimos anos trouxeram à tona a existência de uma enzima relacionada ao desenvolvimento humano, mais especificamente à proliferação celular.

A partir das descobertas das funções e bases genéticas e moleculares da Telomerase, discutidas a seguir, estabeleceu-se um nítido vínculo entre essa enzima e o câncer, doença que sempre desafiou nossa evolução científica.

A cada ano, nos Estados Unidos (EUA) mais de um milhão de indivíduos descobrem que são portadores de algum tipo de câncer. Muitos desses tumores podem ser curados. Entretanto, de acordo com as estimativas da American Cancer Society, o câncer causou, aproximadamente, 564.000 óbitos em 1998, sendo responsável por cerca de 23% de todas as mortes. O medo do câncer, do sofrimento decorrente da doença e do seu tratamento, bem como o benefício limitado para os cânceres mais comuns combinam-se para tornar a prevenção uma prioridade cada vez maior na clínica médica e saúde pública.

Diante disso, é nítido o interesse de cientistas e pesquisadores, e porque não da sociedade como um todo, em determinar tanto o diagnóstico precoce como uma terapêutica efetiva para as neoplasias; e as descobertas acerca da Telomerase sugerem o quão próximos estamos de tal objetivo.

## ***FUNÇÕES DA TELOMERASE***

A estrutura linear do cromossomo eucariótico permite uma maior rapidez na recombinação e ação do que no cromossomo circular procariótico, promovendo benefícios para geração da diversidade biológica (01). O telômero é uma importante estrutura presente nas extremidades de todos os cromossomos humanos. O DNA telomérico consiste de 100 a 1000 repetições em tandem da sequência específica TTAGGG. A enzima DNA polimerase, responsável pela replicação do DNA eucariótico, é incapaz de copiar o trecho final do DNA linear telomérico de cada cromossomo (01), com isso a cada divisão são perdidos aproximadamente 100pb (02). Não somente os telômeros protegem o material genético da perda durante a divisão celular, como também servem como um “relógio mitótico”, dizendo para as células a hora de parar a divisão e ir para senescência. O processo de envelhecimento celular sempre foi um enigma. Muitas teorias têm sido propostas para explicá-lo; recentemente o encurtamento telomérico tem sido proposto como uma das causas para o envelhecimento. A associação entre a senescência celular e o encurtamento telomérico já está bem estabelecida *in vitro* (03).

O encurtamento telomérico e o conseqüente envelhecimento celular é evitado na presença de uma enzima especial chamada Telomerase. Seu papel nas células é adicionar bases aos terminais 3' do DNA molde. Este alongamento do filamento molde permite a síntese ininterrupta do DNA do filamento descontínuo pela atividade normal do complexo DNA polimerase  $\alpha$ /DNA primase. Em células somáticas normais, não há atividade da Telomerase e os telômeros encurtam-se progressivamente com o aumento das divisões celulares até que ocorre uma parada do crescimento, ou senescência. As células germinativas e as pluripotentes contêm atividade da Telomerase, mas somente as primeiras têm níveis suficientes da enzima para estabilizar o comprimento do telômero completamente. A ativação da Telomerase em células cancerosas inativa o relógio

telomérico, que limita a capacidade proliferativa de células somáticas normais, logo sugere-se que o alongamento do telômero pode ser uma etapa importante na formação de tumores.

Vários cânceres humanos têm sido analisados e uma boa correlação foi estabelecida entre a atividade da Telomerase e a malignidade tumoral. Em muitos casos a atividade dessa enzima tem dado valiosas informações sobre o prognóstico tumoral (04).

### ***BASES GENÉTICAS E MOLECULARES DA TELOMERASE***

A Telomerase é composta por um componente de RNA e um componente protéico. A porção RNA da Telomerase humana tem aproximadamente 450 nucleotídeos e possui uma região molde com 11 nucleotídeos que é complementar à seqüência telomérica TTAGGG. O componente protéico da Telomerase pode então dirigir a síntese dos telômeros catalisando a adição de desoxirribonucleotídeos às pontas 3' do cromossomo, usando o componente RNA como molde. O componente RNA da Telomerase, conhecido como hTR ou hTERC, foi identificado em 1995 (05, 06). A subunidade catalítica (hTERT) da Telomerase humana foi identificada independentemente por grupos diferentes em 1997 (05). O gene hTERT (também conhecido como TCS1, TP2, hTRT, hEST2) codifica uma proteína que contém domínios similares àqueles encontrados em outras transcriptases reversas. O hTERC está presente em muitos tipos de células e isso significa que a indução da expressão da proteína hTERT é suficiente para restaurar a atividade da Telomerase nas células (05). Estudos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sugerem que os genes EST2 e p123, ambos possivelmente vinculados à síntese do sítio catalítico da Telomerase, seriam novas classes de transcriptase reversa, as quais não estariam tão relacionadas com a transcriptase de retrovírus como o HIV (07), que é codificada pela região *pol* do material genético viral, mas com os *transposons* (segmentos de DNA que

podem se mover no genoma) encontrados em muitas células. Nesse caso, drogas que inibem a enzima do HIV podem não funcionar contra a Telomerase (07).

### ***DETECÇÃO DA TELOMERASE EM TUMORES***

A atividade da Telomerase é indetectável na maioria das células somáticas humanas, mas em, aproximadamente, 85% dos cânceres e linhagens de células imortais, ela se encontra altamente ativada. Acredita-se que as células cancerígenas readquirem a habilidade de expressar o gene hTERT (01). Além disso, a atividade da Telomerase é ocasionalmente detectada em tecidos adjacentes a tumores (21/361, 6%), possivelmente reflexo da presença de micrometástases ocultas. Em tecidos benignos e pré-malignos, aproximadamente 24% (84/352) expressam atividade da Telomerase. Em certos tipos de tumores, como neuroblastomas, a atividade da Telomerase é geralmente expressa em baixos níveis quando em estágios iniciais de câncer e em altos níveis quando em estágios avançados (08). Entretanto a Telomerase pode não ser considerada como um achado específico da malignidade tumoral, já que ela foi detectada tanto em tumores com alta malignidade, como pineoblastoma e linfoma, quanto em tumores benignos, como adenoma pituitário. Contrariamente, em alguns neuroblastomas, a atividade dessa enzima está ausente. Um grande número de tumores intracranianos que não expressam a Telomerase sugere que mecanismos alternativos de estabilização dos telômeros podem estar presentes (04). Um aspecto interessante diz respeito à atividade da Telomerase em gliomas pediátricos e adultos, uma vez que em 66% (59/90) de gliomas adultos encontrou-se atividade da telomerase, fato este não observado em gliomas pediátricos, 14% (3/21), nos quais observou-se apenas em 25% (1/4) em glioblastomas multiformes e 0% (0/12) em astrocitomas pilocíticos, 0% (0/2) em astrocitomas anaplásicos e 66% (2/3) em

ependimomas. A partir disso, a falta da atividade da Telomerase em gliomas pediátricos sugere que esses possuem células mortais (09).

Além das manifestações cerebrais já discutidas, outros tecidos apresentam a ação da Telomerase em sua tumorigênese:

- **Pulmões e Cavidade Pleural** – a atividade da Telomerase é detectada em carcinomas de pequenas e grandes células; a atividade aumenta quantitativamente desde os tumores normais e carcinóides até os carcinóides atípicos e carcinomas neuroendócrinos (05, 10). Verifica-se que aproximadamente 83% (5/6) dos mesoteliomas ressecados cirurgicamente expressam a atividade da Telomerase, ao contrário do que é verificado freqüentemente em material *post-mortem*, cuja freqüência é de 12,5% (1/8) (05).
- **Pele** – a atividade da Telomerase não é vista apenas em cânceres epiteliais, lesões pré-malignas, por exemplo queratose solar e tumores benignos (05, 11), mas também em exposição da pele ao sol (05, 12). Níveis de atividade da Telomerase parecem correlacionar-se com atividade proliferativa em melanoma cutâneo e com progressão benigna do nevus displásico para o melanoma invasivo e metastático (05, 13). Os níveis de Telomerase podem distinguir melanomas malignos de lesões benignas (05, 14).
- **Esôfago** – a atividade da Telomerase tem sido detectada em carcinomas epidermóides e adenocarcinomas, em carcinomas epidermóides *in situ*, em displasias escamosas e glandulares e, de maneira interessante, no esôfago de Barrett (05, 15).
- **Estômago** – a atividade da Telomerase é vista em carcinomas, adenomas e metaplasia intestinal. Okusa apresentou uma correlação entre o nível de atividade dessa enzima em biópsias de tumores comparado com tecido adjacente normal e, a partir dessa análise, demonstrou que o grau de invasão sugere um possível papel na avaliação pré-operatória de pacientes com câncer gástrico (05, 16).
- **Intestino Grosso** – a atividade da Telomerase é vista em muitos casos de colite (05, 17). 80 a 90% de câncer colorretal não-polipóide esporádico e hereditário (HNPCC) -

carcinomas considerados portadores da atividade da Telomerase (05, 18). Dados mais recentes sugerem que a ação dessa enzima tem sido encontrada em adenomas, com uma correlação entre a frequência de detecção da Telomerase e o grau de displasia dentro do adenoma (05, 19). Além disso, um aumento quantitativo na sua manifestação tem sido demonstrado durante a progressão do adenoma para carcinoma (05, 20).

- **Fígado** – a atividade da Telomerase está presente na hepatite crônica e na cirrose, presumivelmente devido à inflamação celular. Entretanto uma quantificação da atividade da Telomerase pode ter utilidade no diagnóstico de carcinoma hepatocelular proveniente de lesão benigna (05, 21), incluindo hiperplasia adenomatosa (05, 22).
- **Rim** – tumores renais geralmente possuem o modelo padrão de atividade da Telomerase em carcinomas, mas ausência de atividade em tecido renal normal. Entretanto, os carcinomas cromófbos são Telomerase negativos (05, 23). Tumores de Wilms mostram atividade dessa enzima e expressão do gene hTERT (e hTERC). O nível da expressão do hTERT RNAm está relacionado com a taxa de recorrência de tumores histologicamente favoráveis em análises uni ou multivariáveis (05, 24).
- **Cérvix Uterino** – A atividade da Telomerase é detectada com elevada frequência à medida que a severidade da neoplasia intra-epitelial aumenta em carcinomas (05, 25). Um estudo que encontrou altas taxas de atividade da Telomerase para lesões intra-epiteliais de todos os graus, também mostrou que 56% de todas as amostras que apresentaram “atipia reativa”, expressaram a Telomerase ativa (05, 26).

### ***O FUTURO EMPREGO TERAPÊUTICO DA TELOMERASE***

Desde que a atividade da Telomerase mostrou-se necessária para sustentar a proliferação da maioria das células cancerosas, agentes anti-câncer baseados na sua inibição

podem estabelecer uma terapia efetiva, possivelmente com efeitos colaterais limitados. Embora existam riscos que devam ser considerados, como os efeitos inibitórios na expressão da Telomerase em células tronco, é provável que esta abordagem terapêutica seja menos tóxica que quimioterapia convencional, a qual afeta a proliferação celular, inclusive a de células tronco (08).

Todas as células mostram em sua superfície fragmentos de proteínas que elas produzem. Isto auxilia as células imunes do nosso corpo a não atacarem os seus próprios tecidos. Robert Vonderheide, que trabalha no Dana-Farber Cancer Institute, em Boston (EUA), descobriu, em 1999, que células cancerígenas que produzem Telomerase carregam fragmentos dessa enzima na sua superfície, e que essas podem ser reconhecidas em cultura de células por células T ativadas (01). As células T CD4+ são capazes de reconhecer o epítipo HLA DR7, que é restrito à Telomerase humana (27). Devido à presença da Telomerase em mais de 90% das células cancerígena humanas, isso pode vir a tornar-se o tão esperado “Antígeno Tumoral Universal”. Caso isso seja confirmado, o “truque” é pegar as células imunes do paciente para reconhecer os fragmentos de Telomerase em células tumorais. Um meio de fazer isso é apresentar às células dendríticas do paciente o peptídeo antigênico da Telomerase. Quando as células expostas ao peptídeo são infundidas de volta ao paciente elas podem, então, ativar o ataque imune contra às células tumorais em que a Telomerase encontra-se ativa. Outro grupo, com enfoque semelhante, encontra-se na Duke University Medical Center, em Durhan, na Carolina do Norte (EUA), o qual está introduzindo um RNA que sintetiza a Telomerase diretamente dentro das células dendríticas em cultura.

Outra terapia baseada na Telomerase que está sendo explorada por algumas equipes visa destruir as células cancerígenas introduzindo genes que codificam proteínas tóxicas. Está tentando-se introduzir o gene decodificador da CASPASE, uma enzima que leva à destruição da célula. Para assegurar que a caspase seja decodificada somente em células

cancerígenas, os pesquisadores agregam o gene caspase à seqüência do gene Telomerase. A idéia é que esse gene composto se ligará às células cancerígenas como faria a Telomerase por si mesma (01).

Outro aspecto interessante relacionando terapêutica e Telomerase envolve o fato de que o desgaste telomérico pode também ser um fator contribuinte nas doenças crônicas com altas taxas de turnover celular em tecidos específicos, como na medula óssea nos casos de doenças mieloproliferativas, ou nos hepatócitos no caso da cirrose. Nestas doenças, a reativação da Telomerase pode oferecer um novo tratamento. Esta idéia está baseada em um trabalho recente, no qual a introdução do gene codificador do componente RNA do complexo Telomerase preveniu a cirrose no fígado de ratos com atividade deficiente dessa enzima e com lesão hepática crônica induzida experimentalmente (28, 29).

Em suma, enquanto muitas questões ainda continuam sem respostas, o otimismo mostra-se justificado pelas expectativas em torno dos telômeros e da Telomerase e das suas possíveis implicações no diagnóstico, terapêutica e indicadores prognósticos do câncer (08).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS**

01. HAHN W, MEVERSON M: telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med* 33(2)123-129, 2001.

02. TITIA DE LANGE. Telomeres and Senescence: Ending the Debate. *Science*. 279(5349):334-335, January 16, 1998.



03. AHMED A, TOLLEFSBOL T: Telomeres and Telomerase: basic science implications for aging. *J Am Soc* 49(8):1105-1109, 2001.
04. FALCHETTI ML, PALLINI R, LAROCCA LM *et al*: telomerase expression in intracranial tumors: prognostic potential for malignant gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol* 52(3):234-236, 1999.
05. MATTHEWS P, JONES CJ: Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology* 38(6):485-498, 2001.
06. DAMM K, HEMMANN U, GARIN-CHESA P, HAUDEL N, KAUFFMANN I, PRIEPKE H, NIESTROJ C, DAIBER C, ENENKEL B, GUILLIARD B, LAURITSCH I, MULLER E, PASCOLO E, SAUTER G, PANTIC M, MARTENS U M, WENZ C, LINGNER J, KRAUT N, RETTIG W, SCHNAPP A. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO Journal*. 20(24):6958-6968, December 17, 2001.
07. LINGNER J, HUGHES T R, SHEVCHENKO A, MANN M, LUNDBLAD V, CECH T R. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science*. 276(5312):561-567, April 25, 1997.
08. SHAY JW: Telomerase and Cancer: Diagnostics, Prognostics and Therapeutic Implications. Annual Meeting of the Association for molecular pathology, 1995.
09. LANGFORD LA, XU R, STECK PA: telomerase activity in pediatric brain tumors 881. The United States & Canadian Academy of Pathology, Inc 76(1):151, 1997.

10. GOMEZ-ROMAN JJ, ROMERO AF, CASTRO LS, NIETO EH, FERNANDEZ-LUNA JL, VAL-BERNAL JF. Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors: correlation with histologic subtype (MS-0060). *Am. J. Surg. Pathol.* 2000; 24; 417–421.
11. PARRIS CN, JEZZARD S, SILVER A, MACKIE R, MCGREGOR JM, NEWBORN RF. Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Cancer* 1999; 79; 47–53.
12. UEDA M, OUHTIT A, BITO T et al. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res.* 1997; 57; 370–374.
13. MIRACCO C, PACENTI L, SANTOPIETRO R, LAURINI L, BIAGIOLI M, LUZI P. Evaluation of telomerase activity in cutaneous melanocytic proliferations. *Hum. Pathol.* 2000; 31; 1018–1021.
14. RUDOLPH P, SCHUBERT C, TAMM S et al. Telomerase activity in melanocytic lesions: a potential marker of tumor biology. *Am. J. Pathol.* 2000; 156; 1425–1432.
15. UEDA M, KOYANAGI H, TAKEUCHI H, ANDO N, KITAJIMA M. Telomerase activity and abnormal expression of p16 and cyclin D1 in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1997; 112; A635–A635.
16. OKUSA Y, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H, SHINOMIYA N. Clinical significance of telomerase activity in biopsy specimens of gastric cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* 2000; 30; 61–63.

17. YOSHIDA K, SUGINO T, GOODISON S et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br. J. Cancer* 1997; 75; 548–853.
18. LI ZH, SALOVAARA R, AALTONEN LA, SHIBATA D. Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* 1996; 148; 1075–1079.
19. YAN P, SARAGA EP, BOUZOURENE H, BENHATTAR J. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J. Pathol.* 1999; 189; 207–212.
20. IIDA A, YAMAGUSHI A, HIROSE K. Telomerase activity in colorectal cancer and its relationship to bcl-2 \_expression. *J. Surg. Oncol.* 2000; 73; 219–223.
21. TAKAISHI H, KITAMOTO M, TAKAHASHI S *et al.* Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. *Cancer*; 88; 312–317, 2000.
22. KOMINE F, SHIMOJIMA M, MORIYAMA M, *et al.*: Telomerase activity of needle-biopsied liver samples: its usefulness for diagnosis and judgement of efficacy of treatment of small hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*; 32; 235–241, 2000.
23. KINOSHITA H, OGAWA O, MITSUMORI K, KAKEHI Y, TERACHI T, YOSHIDA O. Low frequency of positive telomerase activity in a chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *J. Urol.* 1998; 159; 245–251.

24. DOME JS, CHUNG S, BERGEMANN T et al. High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' tumor. *Cancer Res.* 1999; 59; 4301–4307.
25. NAGAI N, OSHITA T, MURAKAMI J, OHAMA K. Semiquantitative analysis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol. Rep.* 1999; 6; 325–328.
26. SHROYER KR, THOMPSON LC, ENOMOTO T, ESKENS JL, SHROYER AL, MCGREGOR JA. Telomerase expression in normal epithelium, reactive atypia, squamous dysplasia, and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am. J. Clin. Pathol.* 1998; 109; 153–162.
27. SCHROERS R, HUANG XF, HAMMER J *et al*: Identificatio of HLA DR7 –restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res* 62(9):2600-2605, 2002.
28. CHARLES HCM: Telomeres, telomerase and cancer. *N Eng J Med* 342(17):1282-1283, 2000.
29. RUDOLPH KL, CHANG S, MILLARDM et al. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*; 287:1253-1258, 2000.