



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Telomerase como Alvo Terapêutico: Potencial e Desafios dos Inibidores da Telomerase na Terapêutica Anticancerígena

Filipa Soares Ramos

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Telomerase como Alvo Terapêutico: Potencial e Desafios dos Inibidores da Telomerase na Terapêutica Anticancerígena

Filipa Soares Ramos

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2025

Telomerase como Alvo Terapêutico: Potencial e Desafios dos Inibidores da Telomerase na Terapêutica Anticancerígena

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Filipa Soares Ramos)

Copyright© 2025 Filipa Soares Ramos

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“The story of telomerase discovery is a story of the thrill of putting pieces of a puzzle together
to find something new”*

Carol W. Greider

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha mais profunda gratidão à minha família, por todo o apoio que me tem dado ao longo da minha vida. Em especial aos meus pais e à minha tia, que mais que ninguém estiveram presentes nos bons e nos maus momentos, e que com todo o carinho ajudam-me sempre a ultrapassar todos os obstáculos e me incentivam a alcançar os meus objetivos. Sem vocês, este percurso não teria sido possível e, por isso, deixo-vos um obrigado muito especial!

Agradeço ainda à minha Orientadora, a Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, pelo tempo, dedicação e disponibilidade demonstrados ao longo da elaboração desta dissertação. As suas intervenções e sugestões foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de manifestar igualmente um agradecimento em geral a todos os Professores com quem me cruzei ao longo deste percurso académico. Cada um contribuiu não apenas com conhecimento, mas também com valores de rigor, dedicação e espírito crítico, deixando uma marca significativa na minha formação académica e pessoal.

Por fim, e não menos importante, agradeço a todos os meus amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante estes cinco anos de curso, tanto aqueles que já faziam parte da minha vida desde o ensino secundário, como os que tive o privilégio de conhecer ao longo desta etapa, e com os quais formei amizades que levarei comigo para a vida. Juntos nos entretajudámo-nos e partilhámos momentos inesquecíveis, que não só marcaram o meu percurso académico, como também contribuíram para o meu crescimento pessoal. A vossa amizade, apoio e companheirismo tornaram esta caminhada muito mais leve e significativa.

A todos deixo aqui o meu mais sincero Muito Obrigada!

Resumo

O cancro encontra-se atualmente nas principais causas de morte em todo o mundo. Apesar dos avanços significativos na investigação oncológica, subsiste a necessidade de identificar novos alvos terapêuticos que possibilitem o desenvolvimento de compostos inovadores, capazes de aumentar a eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis.

A telomerase é uma holoenzima com atividade de transcriptase reversa existente a nível celular, que tem como principal função o alongamento das sequências terminais protetoras de ácido desoxirribonucleico (ADN) dos cromossomas, mais conhecidas como telómeros. A sua elevada expressão em células com alta taxa proliferativa, como é o caso de células tumorais, confere à mesma um papel central na manutenção da imortalidade celular, o que a torna num alvo seletivo de elevado interesse no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos.

Nos últimos anos, diversos compostos, de origem natural e sintética, têm sido estudados quanto à sua capacidade inibitória desta enzima e potencial utilização na terapêutica. Contudo, a transposição destes inibidores para a prática clínica enfrenta múltiplos desafios, fazendo com que apenas alguns apresentem uma destacada capacidade promissora de virem a ser utilizados futuramente na terapia anticancerígena.

Atualmente, apenas um composto inibidor específico da telomerase se encontra aprovado para uso clínico, o Imetelstat (Rytelo[®]), o qual continua a ser alvo de investigação contínua para ampliar as suas indicações terapêuticas. Outros compostos, especialmente o THIO, MST-312 e o BIBR-1532, também mostram potencial promissor.

Ao longo desta dissertação será efetuada uma revisão crítica do estado da arte no entendimento da telomerase como alvo terapêutico, envolvendo a abordagem da sua biossíntese, estrutura, regulação e mecanismo de ação, bem como uma análise das diversas abordagens inibitórias identificadas até ao momento. Será igualmente abordada a investigação mais recente no campo dos inibidores da telomerase, discutindo os avanços alcançados, as limitações e as perspetivas futuras da sua utilização na terapia anticancerígena.

Palavras-chave: Cancro; Telómeros; Telomerase; Inibidor da Telomerase; Terapia Anticancerígena

Abstract

Cancer is currently among the leading causes of death worldwide. Despite significant advances in oncological research, there remains a need to identify new therapeutic targets that enable the development of innovative compounds capable of increasing the efficacy of currently available treatments.

Telomerase is a holoenzyme with reverse transcriptase activity at the cellular level, whose main function is to elongate the protective terminal sequences of deoxyribonucleic acid (DNA) in chromosomes, better known as telomeres. Its high expression in cells with elevated proliferative capacity, such as tumor cells, gives it a central role in maintaining cellular immortality, making it a selective and highly relevant target in the development of anticancer drugs.

Over the years, several compounds of both natural and synthetic origin have been studied for their telomerase-inhibition activity and potential application in therapy. However, the translation of these inhibitors into clinical practice faces multiple challenges, meaning that only a few have shown truly promising potential for future use in anticancer therapy.

Currently, only one specific telomerase inhibitor has been approved for clinical use, Imetelstat (Rytelo®), which remains under investigation to expand its therapeutic indications. Other compounds, particularly THIO, MST-312 and BIBR-1532, also show promising potential.

Throughout this dissertation, a critical review of the state of art regarding the understanding of telomerase as a therapeutic target will be carried out. This will include an overview of its biosynthesis, structure, regulation, and mechanism of action, as well as an analysis of the inhibitory approaches identified to date. The most recent research in the field of telomerase inhibitors will also be addressed, discussing the advances achieved, current limitations, and future perspectives of its use in anticancer therapy.

Keywords: Cancer; Telomeres; Telomerase; Telomerase Inhibitor; Anticancer Therapy

Índice

Resumo.....	ix
Abstract	x
Índice.....	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e acrónimos	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Cancro	1
1.2. Epidemiologia.....	1
1.3. Carcinogénese.....	3
1.3.1. Fase de iniciação	4
1.3.2. Fase de promoção.....	5
1.3.3. Fase de progressão	5
1.4. Abordagens no tratamento do cancro	6
1.4.1. Cirurgia	6
1.4.2. Radioterapia	6
1.4.3. Quimioterapia.....	7
1.4.4. Imunoterapia	7
1.4.5. Terapia hormonal	8
1.4.6. Terapias-alvo.....	8
2. Os Telómeros, e sua Importância na Regulação do Ciclo Celular	9
2.1. Estrutura dos telómeros	9
2.2. Papel na regulação do ciclo celular	12
3. Telomerase	15
3.1. Contexto histórico e função da enzima.....	15
3.2. Estrutura molecular	15
3.2.1. Subunidade hTERT	17
3.2.2. Subunidade hTERC.....	18
3.3. Biossíntese e mecanismos de regulação	19
3.4. Mecanismo de ação	21
4. O Papel da Telomerase na Carcinogénese.....	23
4.1. Mecanismos de ativação.....	23
4.2. Regulação da expressão.....	25
4.3. Funções extra-teloméricas do domínio hTERT.....	27
4.4. Neoplasias associadas a elevada atividade da telomerase	30

5.	A Telomerase como Alvo Terapêutico.....	35
5.1.	Estratégias na modelação da atividade da telomerase	35
5.1.1.	Abordagem direta.....	35
5.1.2.	Abordagem indireta.....	36
5.1.3.	Abordagens mais recentes.....	37
5.2.	Principais classes de inibidores da telomerase	38
5.2.1.	Moléculas sintéticas derivadas de ácidos nucleicos	39
5.2.1.1.	Oligonucleótidos antissenso.....	39
5.2.1.2.	Oligonucleótidos homólogos de telómero	41
5.2.1.3.	Tiopurinas	42
5.2.2.	Pequenas moléculas não nucleosídicas	43
5.2.2.1.	Inibidores diretos.....	43
5.2.2.2.	Inibidores que atuam por estabilização de G-quadruplex	45
5.2.3.	Imunoterapia antitelomerase	52
6.	Estudos no Desenvolvimento de Inibidores da Telomerase	57
6.1.	Visão geral dos estudos	57
6.2.	Principais fármacos em estudo	59
6.2.1.	Imetelstat	63
6.2.2.	THIO	66
6.2.3.	MST-312	67
6.2.4.	BIBR-1532	68
6.3.	Desafios e limitações terapêuticas dos inibidores de telomerasas.....	69
6.4.	Perspetivas futuras.....	72
7.	Conclusões.....	75
8.	Referências Bibliográficas.....	77

Índice de figuras

Figura 2.1. Representação das estruturas de ADN telomérico e do complexo Shelterin.....	10
Figura 2.2. Estrutura em G-quadruplex.....	11
Figura 2.3. Representação do encurtamento dos telómeros após o processo de replicação do ADN em cada divisão celular.....	13
Figura 3.1. Holoenzima telomerase humana, baseado na estrutura obtida por microscopia crioeletrónica.....	17
Figura 3.2. Representação esquemática do recrutamento da telomerase e do processo de extensão das cadeias de ADN telomérico	22
Figura 4.1. Representação esquemática do papel da disfunção telomérica e ativação da telomerase no processo de génese e progressão tumoral.....	24
Figura 4.2. Representação das funções não canónicas da componente hTERT na carcinogénese	29
Figura 5.1. Diferentes estratégias terapêuticas anticancerígenas baseadas na telomerase	38
Figura 5.2. Representação da estrutura base de uma molécula oligonucleotídica	39
Figura 5.3. Representação da estrutura química do Imetelstat.....	40
Figura 5.4. Representação das estruturas químicas dos inibidores nucleosídicos tiopurínicos 6-tioguanina e 6-tioguanina-2'-desoxiguanosina (6-thio-dG), esta conhecida como THIO	43
Figura 5.5. Representação das estruturas químicas da 3-galato-epigallocatequina (EGCG), com o grupo galato destacado a laranja, do seu derivado, o composto MST-312, e do composto BIBR-1532.	44
Figura 5.6. Representação da estrutura química de uma bisamidoantraquinona com efeito estabilizador de estruturas G-quadruplex, e da Telomestatina.	46
Figura 5.7. Representação da estrutura química da Piridostatina, com indicação dos tipos de interação formadas com o alvo.....	47
Figura 5.8. Representação estruturais dos derivados tricíclicos de acridina com estrutura linear, BRACO-19, AS1410 e BSU6037, e com estrutura pentacíclica, RHPS4.....	48
Figura 5.9. Representação das estruturas químicas da Quarfloxina e do Pidnarulex.....	50
Figura 5.10. Representação da estrutura química base das porfirinas, da estrutura química base das metaloporfirinas, e do composto TMPyP4.....	51
Figura 5.11. Representação do mecanismo seletivo de ação da Telomelisina em células normais versus células cancerígenas.	55

Índice de tabelas

Tabela 6.1. Visão geral dos ensaios pré-clínicos e clínicos no desenvolvimento dos inibidores da telomerase mais promissores.....	60
Tabela 6.2. Visão geral dos ensaios clínicos atualmente a decorrer envolvendo os inibidores da telomerase mais promissores.....	62

Lista de abreviaturas e acrónimos

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
ALT – Mecanismo alternativo de alongamento telomérico, do inglês: alternative lengthening of telomere
ARN – Ácido ribonucleico
ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro
ATR – *Ataxia-telangiectasia and Rad3 related*
ATM – *Ataxia-telangiectasia mutated*
BRG1 – *Brahma-related gene 1*
c-MET – *Cellular mesenchymal-epithelial transition*
CE – Comissão Europeia
CST – Complexo CTC1-STN1-TEN1
CTE – Domínio de extensão C-terminal, do inglês: C-terminal extension
CR4/5 – Regiões conservadas 4 e 5, do inglês: conserved region 4 and 5
CR7 - Região conservada 7, do inglês: conserved region 7
EGCG – 3-galato-epigallocatequina, do inglês: Epigallocatechin-3-gallate
G4 – G-quadruplex
G4s – *G-quadruplexes*
GAR1 – *Glycine/arginine-rich domain protein 1*
hTERC ou hTR – Componente RNA da telomerase humana, do inglês: human telomerase RNA component
hTERT – Domínio transcriptase reversa da telomerase humana, do inglês: human telomerase reverse transcriptase
IARC – *International Agency for Research on Cancer*
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês: mitogen-activated protein kinase
miARNs – Micro ácidos ribonucleicos
c-Myc – *Cellular myelocytomatosis*
NF- κ B – Fator nuclear κ B, do inglês: nuclear factor κ B
NHP2 – *Non-histone protein 2*
NOP10 – *Nucleolar protein 10*
OMS – Organização Mundial da Saúde
p53 – Proteína 53
POT1 – *Protection of telomeres protein 1*
PK/t – *Pseudoknot/template*
RAP1 – *Repressor activator protein 1*
RT – Transcriptase reversa, do inglês: reverse transcriptase
SMDs – Síndromes mielodisplásicas
Sp1 – *Specificity protein 1*
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
T-loop – Laço telomérico, do inglês: Telomere loop
TCAB1 – *Telomerase cajal body 1*
TE – Trombocitemia essencial
TEN – Domínio N-terminal essencial da telomerase, do inglês: telomerase essential N-terminal
TIN2 – *TRF1 interacting nuclear protein 2*
TPP1 – Tripeptidil-peptidase 1
TRBD – Domínio de ligação ao ARN da telomerase, do inglês: telomerase RNA binding domain
TRF1 – *Telomere repeat-binding factor 1*
TRF2 – *Telomere repeat-binding factor 2*

1. Introdução

1.1. Cancro

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define genericamente o cancro como “um grande grupo de doenças caracterizado pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais que podem ter origem em qualquer órgão ou tecido do corpo” (1). Outros termos utilizados, como tumores ou neoplasias malignas, apresentam o mesmo significado. As neoplasias caracterizam-se como uma massa anormal de tecido gerada por uma divisão descontrolada e persistente de células, podendo ser de carácter benigno ou maligno. A diferenciação entre neoplasias benignas e malignas (ou cancro) é feita com base na análise de características morfológicas, funcionais e comportamentais das células que lhe deram origem, principalmente em relação à capacidade de invasão de órgãos e tecidos vizinhos ou de disseminação por outras regiões do organismo, um processo denominado por metastização, que é característico de células malignas e se verifica numa situação de cancro (2).

O desenvolvimento de uma neoplasia, benigna ou maligna, pode ter início em quase qualquer órgão ou tecido do corpo (3). Estão identificados mais de 200 tipos de cancro, que são classificados principalmente de acordo com o tipo de tecido de origem (tipo histológico) e o tipo de célula envolvida, ou de acordo com o órgão e local no organismo onde tiveram origem (3,4). A maioria dos cancros encontram-se agrupados em três grupos principais: o grupo dos Carcinomas inclui cerca de 90% dos cancros, englobando os que se desenvolvem em células epiteliais; o grupo dos Sarcomas engloba os tumores sólidos de tecido conjuntivo; o grupo das Leucemias e Linfomas, que inclui cerca de 8% dos cancros, engloba os que se desenvolvem a partir de células progenitoras sanguíneas e do sistema imune, respetivamente (5).

1.2. Epidemiologia

O cancro é um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI, sendo responsável por quase uma em cada seis mortes (16,8%) em todo o mundo, e por uma em cada quatro mortes (22,8%) se considerarmos apenas as mortes por doenças não transmissíveis. Segundo estatísticas da OMS, o cancro foi responsável por cerca de 9,7 milhões de mortes em 2022. Aproximadamente um em cada cinco homens ou mulheres desenvolve cancro ao longo da sua vida, sendo que um em cada nove homens e uma em cada 12 mulheres morrem devido a esta

doença. Deste modo, o cancro representa uma importante barreira no aumento da esperança de vida, acarretando também elevados custos económicos e sociais (3).

Relativamente à incidência dos vários tipos de cancro, os dados mundiais de 2022 apresentados pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* destacam o cancro do pulmão como responsável pelo maior número de novos casos (2,48 milhões), seguido do cancro da mama feminino (2,31 milhões de novos casos), do cancro colorretal (1,93 milhões de novos casos) e do cancro da próstata (1,47 milhões de novos casos). Relativamente à mortalidade, o cancro do pulmão surge como responsável pelo maior número de mortes (cerca de 1,82 milhões), encontrando-se em segundo lugar o cancro colorretal (cerca de 904 mil). De acordo com dados recolhidos em 185 países, nos homens o cancro da próstata é o mais frequente, enquanto nas mulheres predominam o cancro da mama e o cancro cervical. Em relação às taxas de incidência nas diferentes regiões do mundo estas refletem amplamente as diferenças na exposição aos diferentes fatores de risco dominantes, respetivos para cada tipo de cancro, assim como barreiras na prevenção, deteção precoce e tratamento eficaz, verificando-se nomeadamente que o cancro do pulmão afeta principalmente as zonas da Ásia oriental, Micronésia/Polinésia e Europa, enquanto o cancro da mama apresenta maior incidência nas regiões da Austrália, América do Norte e Europa (3).

Em Portugal o cancro é a segunda maior causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares, à semelhança do que se verifica no resto da Europa. Na última década têm-se observado poucas melhorias no controlo da mortalidade por cancro, porém a incidência estimada é uma das mais baixas da União Europeia (6,7). De acordo com dados da IARC, foram registados em Portugal, em 2022, 69 567 novos casos de cancro e 33 762 mortes por cancro, sendo o risco de morte por cancro de 11,2%, antes dos 75 anos de idade, para ambos os sexos. De entre os tipos de cancro com maior incidência, destaca-se o cancro colorretal (10 575 novos casos), o cancro da mama (8 954 novos casos), e o cancro da próstata (7 529 novos casos). O cancro que apresenta maior taxa de mortalidade é o do pulmão, seguido do cancro da mama, à semelhança do que se verifica no resto do mundo (3).

A incidência de cancro encontra-se associada a diversos fatores de risco, que podem diferir entre os vários tipos de cancro. Alguns fatores de risco são controláveis, tais como a exposição ambiental a compostos químicos ou outras substâncias, como por exemplo fármacos, nomeadamente agentes imunossupressores, ou os resultantes de determinados estilos de vida, como o consumo de álcool, principal fator de risco no desenvolvimento de cancro do fígado, o tabagismo, importante fator que justifica a elevada incidência de cancro do pulmão, uma dieta

pobre, falta de atividade física ou excesso de peso. Para além destes fatores, infeções por determinados patógenos, como por exemplo o vírus da imunodeficiência humana (VIH), bactérias ou parasitas, podem também estar na origem de cancro. Acrescem os fatores não controláveis, que também desempenham um papel significativo na génese e desenvolvimento de cancro. A idade é o principal fator de risco para muitos tipos de cancro, possivelmente devido aos efeitos do envelhecimento, que acarretam perda de eficácia dos mecanismos de reparação celular e de resposta imune, associada ao aumento da prevalência de comorbilidades, tais como diabetes, obesidade e síndrome metabólica. A predisposição genética e a etnia também são fatores de risco importantes, predeterminando ou facilitando o desenvolvimento de tipos específicos de cancro (8,9).

Ao longo dos anos têm sido implementadas medidas de sensibilização, prevenção e deteção precoce de alguns dos tipos de cancro com maior incidência, tanto a nível nacional, pela Liga Portuguesa Contra o Cancro, como a nível europeu, pela Comissão Europeia (CE) (10,11). A CE atualmente apresenta o cancro como uma das principais prioridades, tendo criado em 2021 um Plano Europeu de Combate ao Cancro¹ que visa apoiar os Estados-Membros em todos os aspetos fundamentais da abordagem ao cancro. Uma das prioridades deste plano também se centra no auxílio de indústrias relativamente à promoção de pesquisas e tecnologias de modo a atender às necessidades terapêuticas deste tipo de pacientes, entre elas o desenvolvimento de medicamentos com qualidade, seguros e eficazes (11).

Para além de se verificar a nível europeu, a nível nacional também têm surgido medidas de apoio à promoção de investigação científica na área do cancro, tanto ao nível pré-clínico como translacional, com vista ao desenvolvimento de novas terapias que permitam uma maior eficácia no tratamento e também uma melhoria da qualidade de vida dos doentes (10).

1.3. Carcinogénese

O desenvolvimento de cancro é um processo complexo e multifacetado que envolve o desequilíbrio de vários mecanismos moleculares complexos e vias regulatórias (12). Este

¹ Plano europeu, apresentado em fevereiro de 2021, que constitui um compromisso político e estratégico da União Europeia no reforço da luta contra o cancro. Estrutura-se em torno de quatro áreas de intervenção principais, a prevenção e deteção precoces, diagnóstico e tratamento, e qualidade de vida de doentes e sobreviventes, apoiadas por dez iniciativas emblemáticas e várias ações complementares, com os principais objetivos de garantir maior equidade no acesso, promover inovação científica e apoiar os Estado-Membros na implementação de políticas de saúde eficazes (11).

processo de transformação de um tecido normal em tecido cancerígeno divide-se em vários estágios, sendo que o passo inicial de iniciação tumoral resulta, na maioria dos casos, da ocorrência de uma mutação oncogénica numa única célula somática. Esta mutação confere à célula vantagens clonais, permitindo a sua rápida multiplicação, uma fase de promoção tumoral associada a uma acumulação progressiva de novas alterações genéticas e epigenéticas, promovendo uma fase de progressão do tumor que resulta numa lesão irreversível, altamente heterogénea e invasiva (13).

1.3.1. Fase de iniciação

O surgimento de células cancerígenas é impulsionado principalmente pela exposição a determinadas substâncias, por exemplo produtos químicos, radiação ou agentes biológicos, de origem endógena ou exógena, que podem ser classificados como genotóxicos ou não genotóxicos, dependendo do seu mecanismo de ação (14).

As alterações moleculares que desencadeiam um processo de carcinogénese podem ser de carácter genético, desde variações num único nucleótido presente na sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) da célula até alterações cromossomais em larga escala, as quais resultam numa expressão genética anormal, levando a deficiências nos mecanismos supressores de tumor, à formação de oncogenes ou a uma amplificação oncogénica. Podem ser determinadas por alterações epigenéticas, que se caracterizam por modificações ao nível da expressão da informação que codifica para a identidade celular, que podem ser passadas para a célula-filha (13). Tais alterações ocorrem ao nível da regulação da expressão genética mediada pela cromatina, incluindo metilações no ADN, metilações e acetilações nas histonas e alterações na expressão do ácido ribonucleico (ARN) (15).

Os mecanismos que podem desencadear uma iniciação tumoral englobam estados inflamatórios, sendo reconhecido que as citocinas e os fatores de crescimento envolvidos na inflamação crónica apresentam um papel pró-tumorigénico importante, lesões químicas e mediadas por radicais, caracterizadas como agentes cancerígenos ambientais, bem como fatores metabólicos, o microbioma e a idade (14).

1.3.2. Fase de promoção

A segunda fase do processo de carcinogénese, designada por fase de promoção, envolve a expansão clonal seletiva da célula alterada, com formação de um grupo de células pré-neoplásicas idênticas geneticamente. Esta fase caracteriza-se pelo aumento no número de células anormais, seja por meio da proliferação celular ou por diminuição da extensão da morte celular programada (apoptose), em que são contornados mecanismos de senescência replicativa e eventual morte celular (13).

Para além da adaptação intrínseca por parte deste tipo de células alteradas também ocorre uma remodelação do microambiente em que estas se encontram, propiciando uma adaptação adequada às necessidades destas células (13).

Existem também compostos que favorecem o aumento da expansão clonal, os promotores tumorais. Estes compostos não são mutagénicos, e geralmente não são capazes de induzir tumores por si só, mas agem por múltiplos mecanismos envolvendo mudanças na expressão genética que resultam numa proliferação sustentada de lesões pré-neoplásicas, fornecendo às células cancerígenas uma vantagem de crescimento seletivo sobre as células normais circundantes. Este evento apresenta carácter reversível, pois caso ocorra remoção do estímulo de crescimento endógeno ou exógeno, as células focais alteradas podem permanecer num estado estável ou aumentar a sua taxa apoptótica (16).

1.3.3. Fase de progressão

Em resultado do acúmulo de mutações genéticas aleatórias e da seleção de células que abrigam mutações, que lhes conferem uma vantagem de crescimento sob certas condições, dá-se a fase de progressão tumoral. Esta fase caracteriza-se pelo possível desenvolvimento de tumores malignos, desencadeando os processos de metastização (17).

Após um crescimento descontrolado de células tumorais, dependendo de vários fatores intrínsecos e extrínsecos ao tumor primário, pode ocorrer disseminação de células cancerígenas, por meio da circulação sanguínea ou linfática. Estas células chegam a locais distantes do organismo, onde se estabelecem e se multiplicam originando micrometástases, as quais posteriormente progridem a metástases. As metástases são responsáveis pela maioria das mortes causadas por cancro (17,18).

1.4. Abordagens no tratamento do cancro

Ao longo dos anos tem-se observado um franco desenvolvimento nas terapêuticas oncológicas, salientando-se a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia como os três principais pilares no tratamento do cancro. Mais recentemente têm sido desenvolvidas novas abordagens terapêuticas anticancerígenas, destacando-se a imunoterapia, já definida como o quarto pilar no tratamento do cancro. Para além destas, a terapia hormonal e as terapias-alvo têm vindo a ganhar proeminência como estratégias alternativas ou complementares (19,20). O plano de tratamento depende, essencialmente, do tipo de cancro, do estágio da doença e do tipo de tratamento a efetuar (20).

1.4.1. Cirurgia

A cirurgia é o tratamento de primeira linha de muitos tumores sólidos e envolve a remoção ou a ressecção máxima possível do tumor primário, de modo a não deixar vestígios de células cancerígenas na margem. Tal nem sempre é possível, tornando-se necessário nesses casos efetuar, em combinação, radioterapia e/ou quimioterapia (21).

1.4.2. Radioterapia

A radioterapia compreende a utilização de radiação ionizante para destruir ou inibir o crescimento de células tumorais. Os tipos de radiação mais utilizados neste contexto são radiação eletromagnética, como raios X ou raios gama, ou partículas como prótons, neutrões ou eletrões. De acordo com o modo de administração, pode ser efetuada radiação externa, em que há emissão do feixe por uma fonte externa, radiação interna (radiação por implante ou braquiterapia), em que o feixe provém de material radioativo contido em materiais implantados diretamente no local ou perto do tumor, e ainda radiação sistémica, em que o feixe provém de uma substância radioativa que circula em todo o organismo (20).

1.4.3. Quimioterapia

A quimioterapia do cancro consiste na utilização farmacológica de entidades químicas que inibem a proliferação celular e a progressão do tumor, de modo a evitar a invasão e metástase. Pode consistir na administração de apenas uma entidade química farmacologicamente ativa (fármaco) ou envolver uma associação de fármacos, que podem ser administrados por várias vias, sendo mais frequentes as vias oral e parenteral. Os fármacos geralmente utilizados na quimioterapia do cancro atuam em processos químicos celulares relevantes para a síntese de ADN, ARN ou proteínas, ou afetam o funcionamento apropriado das estruturas macromoleculares preformadas, comprometendo os processos que garantem a viabilidade celular e os processos de replicação (20,22).

A quimioterapia pode ser utilizada em cenários neoadjuvantes, adjuvantes, combinados e metastáticos. A terapia neoadjuvante corresponde à sua administração antes do tratamento primário, na maioria dos casos a cirurgia. A terapia adjuvante é aplicada para além do tratamento primário, de modo a suprimir o crescimento de células cancerígenas ocultas, difíceis de eliminar recorrendo apenas ao tratamento principal efetuado, e a eliminar estas células. A quimioterapia combinada consiste na utilização de mais do que uma substância ativa, com o propósito de aumentar a eficácia na eliminação das células tumorais, pois a associação de fármacos corresponde geralmente a uma terapia multialvo, em que está envolvido mais do que um mecanismo de ação, permitindo deste modo reduzir a capacidade de seleção para resistências e podendo também permitir um melhor controlo da toxicidade (22).

1.4.4. Imunoterapia

A imunoterapia, também designada por terapia biológica, utiliza a capacidade natural do organismo para combater o cancro, através da utilização de compostos imunomoduladores que estimulam ou inibem determinados processos, culminando no reforço da capacidade do sistema imune para reconhecimento e eliminação das células cancerígenas (20).

Nos últimos anos este tipo de terapia tem alterado substancialmente o cenário do tratamento clínico do cancro, superando a terapia padrão em vários tipos de cancro e permitindo alcançar resultados notáveis numa série de casos, como regressão total de tumores em estágio avançado ou aumento da sobrevida dos pacientes (23).

1.4.5. Terapia Hormonal

A terapêutica hormonal atua pela inibição da ação de hormonas naturais endógenas sobre as células cancerígenas, das quais estas necessitam para se desenvolver. Este tipo de terapia anticancerígena é efetuado quando é demonstrado que o cancro apresenta recetores hormonais, destacando-se os cancros relacionados com o aparelho reprodutor, como o cancro da mama e o cancro da próstata (20).

1.4.6. Terapias – alvo

As terapias-alvo, ou terapias moleculares direcionadas, possibilitaram melhorias significativas no tratamento oncológico nos últimos anos, beneficiando de avanços na investigação que conduziram a uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento tumoral. As terapias-alvo fazem parte de uma estratégia designada por “medicina de precisão”, pois atuam seletivamente nas células cancerígenas, sendo utilizados fármacos ou outras substâncias que identificam com precisão moléculas-alvo apenas presentes nestas células. As terapêuticas-alvo são desenvolvidas e ajustadas de acordo com as características da doença e com o(s) alvo(s) que se pretende alcançar, podendo estes tratamentos ser administrados em monoterapia ou em combinação com outros tipos de tratamento oncológico (24).

Esta terapêutica permite atingir o efeito desejável, prevenindo efeitos adversos resultantes da atuação dos fármacos em células não cancerígenas e controlando os processos de seleção para resistências, fenómenos que têm sido identificados ao longo dos anos e que representam um óbice relevante na eficácia e segurança das terapêuticas anticancerígenas (20,24).

2. Os Telómeros, e sua Importância na Regulação do Ciclo Celular

2.1. Estrutura e função dos telómeros

Os telómeros são estruturas protetoras presentes nas terminações do ADN eucariótico, que apresenta cadeia em dupla-hélice linear. Servem como regiões *cap*, presentes em cada braço de todos os cromossomas, o que permite manter a sua estabilidade, assegurando a integridade da informação genética que transita da célula-mãe para as células-filhas (25). O conceito de telómeros foi descrito na década de 1930 por Barbara McClintock e Hermann Müller, os quais observaram presente, no material genético das espécies *Zea mays*, comumente conhecido como milho, e do inseto *Drosophila melanogaster*, a existência de estruturas distintas nas extremidades cromossômicas. Estas estruturas foram posteriormente identificadas como fundamentais na proteção dos cromossomas (26,27).

As estruturas cromossômicas teloméricas são constituídas por longas extensões hexaméricas não codificantes, altamente conservadas, compostas, em humanos, por repetições do segmento 5'-TTAGGG-3', formando uma cadeia dupla em que uma das cadeias é rica em nucleótidos de guanina (a cadeia líder, sintetizada de forma contínua no sentido 5'-3') e a outra, complementar, é rica em nucleótidos de citosina (a cadeia atrasada, sintetizada de forma descontínua) (25).

O ADN telomérico humano apresenta principalmente cadeia dupla, com uma dimensão de cerca de 2 000 a 15 000 pares de bases, mas apresenta também uma porção terminal em cadeia simples na região 3', com cerca de 50-300 nucleótidos, formando uma saliência rica em nucleótidos de guanina que pode ligar-se a uma região telomérica rica em nucleótidos de citosina da dupla cadeia a montante (estrutura *D-loop* ou laço de deslocamento), formando uma estrutura em círculo conhecida como *telomere loop* (T-loop), representado na Figura 2.1. Esta estrutura tem como principal função alicerçar as terminações de ADN soltas, prevenindo a sua exposição e reconhecimento como zonas que necessitam de reparação (25,28).

A estrutura bioquímica do *T-loop* é termodinamicamente instável, requerendo a presença de complexos proteicos associados. Existem várias proteínas associadas ao telómero que, em conjunto, formam o telossoma. Algumas estão envolvidas em mecanismos de resposta a lesão do ADN, por exemplo a *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK), a proteína 53 (p53), a *polyadenosine diphosphate ribose polymerase* (PARP), as tanquirases 1 e 2, bem como as estruturas *excision repair cross-complementing associated with xeroderma pigmentosum group F* (ERCC/XPF), *radiation 51* (RAD51), helicase da síndrome de Werner (WRN) e a helicase

da síndrome de Bloom (BLM). Outras desempenham papéis relevantes na organização nuclear, como as *lamin associated proteins* (LAP) e proteínas *silent information regulator proteins* (SIR), as quais também estão associadas ao controlo epistático do comprimento do telómero. A presença e atividade destas proteínas na sequência telomérica é comandada por 6 proteínas principais, especializadas, que em conjunto formam o complexo *Shelterin*. Este complexo, representado na Figura 2.1, auxilia na criação da estrutura *cap* funcional, na região terminal do cromossoma (29,30). Engloba as proteínas *telomere repeat-binding factor 1* (TRF1), *telomere repeat-binding factor 2* (TRF2), *TRF1 interacting nuclear protein 2* (TIN2), *repressor activator protein 1* (RAP1), *tripeptidil-peptidase 1* (TPP1) e *protection of telomeres protein 1* (POT1) (28,31).

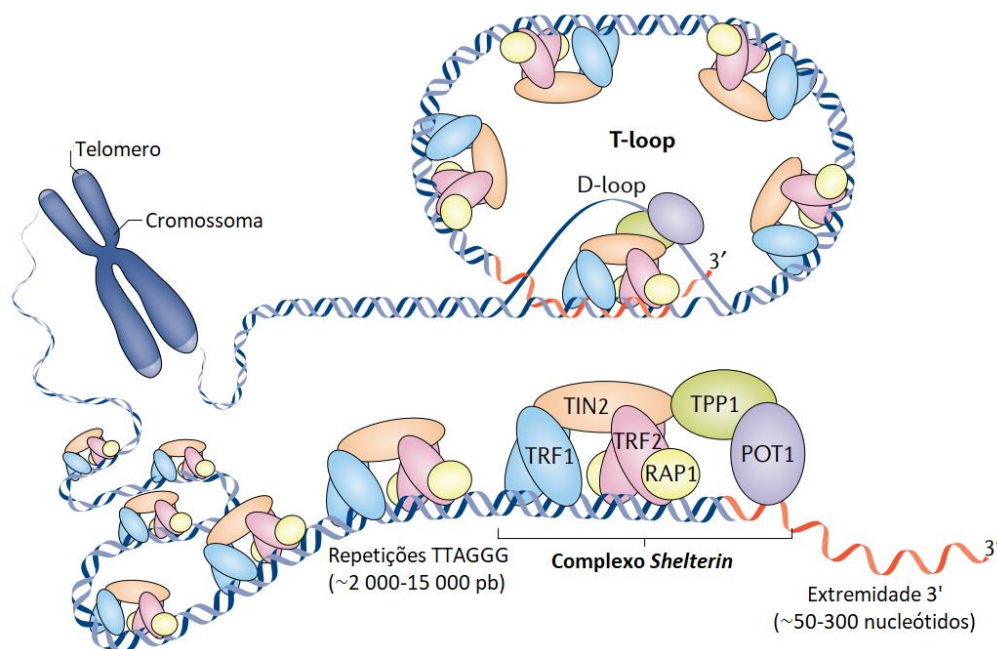


Figura 2.1 – Representação das estruturas do ADN telomérico e do complexo Shelterin. *Adaptado de (28).*

O complexo *Shelterin* interage com a cadeia dupla telomérica e também com a porção final de cadeia simples. As proteínas TRF1 e TRF2 são homodímeros que se ligam à dupla cadeia de ADN telomérico e que juntam as restantes proteínas. A proteína TRF1 tem como principal função regular o comprimento do telómero, enquanto a TRF2 estabiliza a estrutura em T-loop. A proteína POT1 liga-se à região de ADN de cadeia simples, sendo responsável pela manutenção dessa região dos telómeros. Por sua vez, a proteína TIN2 interage com ambas, TRF1 e TRF2, estabilizando-as, enquanto a RAP1 interage apenas com a proteína TRF2. Na extremidade 3' projetada, a POT1 liga-se à cadeia dupla por meio de interação com a proteína

TPP1, que se encontra também ligada à TRF1 e TRF2 por meio da TIN2, como representado na Figura 2.1 (28,30,31).

A presença de uma elevada quantidade de nucleótidos de guanina na sequência de ADN da região telomérica possibilita a existência de estruturas secundárias no ADN telomérico, as quais se denominam de *G-quadruplexes* (G4s), estrutura representada na Figura 2.2. Estas estruturas correspondem a tetrâmeros formados por quatro bases de guanina ligadas entre si por pareamento de bases através de ligações de hidrogénio de Hoogsteen, que podem assumir diferentes conformações, sendo que a sua estrutura de tétrades empilhadas é estabilizada pela presença de iões K^+ (32). Podem ser encontradas em ADN e também em ARN, conferindo elevada estabilidade a estas estruturas, o que contribui para a regulação da atividade catalítica enzimática e para a proteção de mecanismos de sinalização e reparação do ADN, como se pode verificar nas regiões terminais dos telómeros. A região em que a estrutura G-quadruplex (G4) se conecta com a estrutura em dupla-hélice do ADN (duplex) denomina-se de interface quadruplex-duplex. (33).

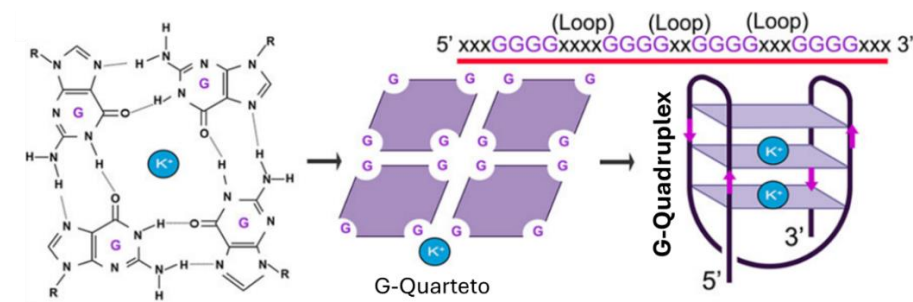


Figura 2.2 – Estrutura em G-quadruplex. *Adaptado de (32).*

Os telómeros apresentam ainda a capacidade de serem transcritos mesmo estando restritos a uma estrutura heterocromática, de associação entre ADN e proteínas numa forma altamente condensada. Este processo resulta numa síntese de moléculas de ARN não codificantes conhecidos como *telomeric repeat-containing RNA* (TERRA). Esta apresenta uma atividade essencial no controlo da atividade da telomerase e na formação da heterocromatina nas regiões terminais dos cromossomas (34).

2.2. Papel na regulação do ciclo celular

O ciclo celular é um mecanismo biológico que controla o crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular e regeneração de organismos eucariotas. Trata-se de um processo altamente regulado e que engloba diversas fases, iniciado por uma fase de quiescência, a fase *gap 0* (G0), a que se seguem as fases de proliferação, nomeadamente a fase *gap 1* (G1), a fase de síntese (S), durante a qual ocorre a síntese do material genético, *gap 2* (G2) e, por fim, a mitose (M), no decorrer da qual se dá a divisão celular da célula-mãe, originando células-filhas. Ao longo destas fases principais ocorrem, em determinados pontos, processos de verificação e controlo que garantem correção na replicação do ADN e divisão celular (35).

À medida que se sucedem as divisões celulares, a replicação do ADN origina uma diminuição sucessiva do comprimento dos cromossomas devido ao que é conhecido como “problema do fim da replicação”, inicialmente descrito por Alexei Olovnikov em 1971, e que corresponde a um fenómeno de perda de pares de bases nas regiões terminais dos cromossomas (36), processo representado na Figura 2.3. Este problema surge devido à atividade da enzima ADN polimerase, que sintetiza novo ADN apenas no sentido 5' para 3', o que requer o auxílio da enzima primase na síntese da cadeia atrasada, sendo esta enzima responsável por sintetizar múltiplos *primers* de ARN, os quais fornecem grupos 3' OH livres, disponíveis para a adição posterior de nucleótidos pela ADN polimerase, o que leva à formação dos fragmentos de Okasaki, subsequentemente ligados entre si para formar a nova cadeia de ADN. Os fragmentos de ARN são mais tarde substituídos por nucleótidos pela enzima ADN polimerase, o que ocorre em todo o ADN exceto nas terminações teloméricas, as quais carecem de um *primer*, dando-se assim a perda de um fragmento da cadeia de tamanho superior ao de um *primer* de ARN no terminal 5' da cadeia atrasada, após a remoção do último *primer*, no fim da replicação (29,36).

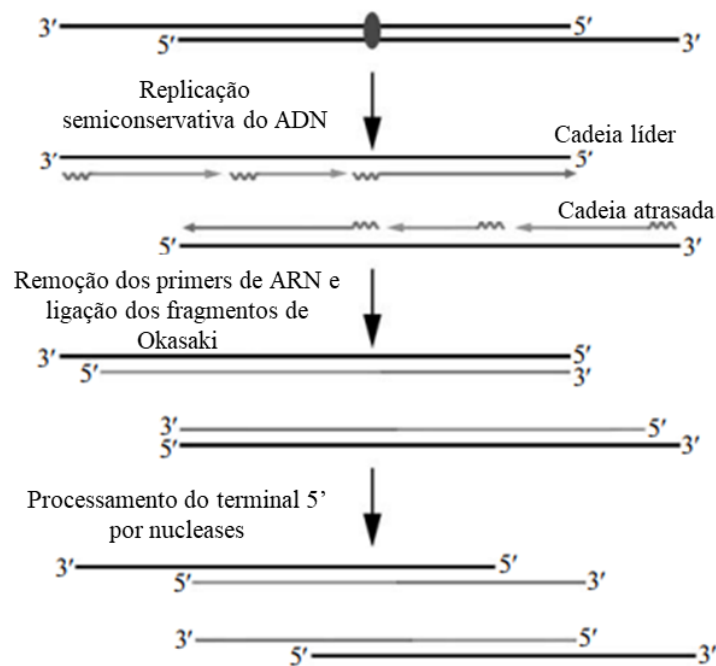


Figura 2.3 – Representação do encurtamento dos telómeros após o processo de replicação do ADN em cada divisão celular. *Adaptado de (37).*

A presença destes complexos proteína-ADN não codificante nas terminações cromossomais é essencial, não só para proteger os braços do cromossoma de mecanismos de reparação do ADN inapropriados, que poderiam ser identificados como cadeias quebradas, e da possibilidade de ocorrência de fusões cromossomais nessa região, mas também para evitar a perda, em cada divisão celular, de informação genética necessária ao normal funcionamento celular, ocorrendo em contrapartida perda de informação não essencial. Consequentemente, verifica-se uma diminuição gradual do comprimento dos telómeros ao longo do tempo de vida da célula, que ao fim de um número limitado de divisões celulares assumem um tamanho crucialmente pequeno, ocorrendo a perda de componentes do complexo *Shelterin*, os quais deixam de se conseguir complexar, culminando na alteração da configuração normal da estrutura *T-loop* e consequente exposição das terminações cromossomais (29,38).

A exposição das terminações cromossomais determina a perda da capacidade de proliferação celular, pois leva à passagem da fase G1 à fase G0 do ciclo celular e ao desencadeamento de vias de resposta celulares, iniciados pela fosforilação da proteína *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) ou da proteína *ataxia-telangiectasia and Rad3-related* (ATR). Ambas desencadeiam a fosforilação da p53, expressão da proteína 21 (p21) e inibição de cinases dependentes de ciclina, as quais iriam possibilitar a progressão do ciclo celular em condições normais. Ao abandonar o

ciclo celular a célula pode entrar num estado de senescência, definido como a cessação irreversível da divisão celular, ou num estado de apoptose, correspondente à morte celular programada. Deste modo, em situações normais as células apresentam uma capacidade replicativa limitada, o qual pode ser referido também como limite de Hayflick, nome de um dos investigadores responsáveis pela apresentação desta teoria no ano de 1961 (39,40). Estes mecanismos tornam-se então fundamentais para evitar a multiplicação de linhagens celulares com defeitos ao nível da sua informação genética (29).

3. Telomerase

3.1. Contexto histórico e função da enzima

Em 1985, após o conhecimento estabelecido da existência de telómeros, Carol Greider e Elizabeth Blackburn afirmaram que estas estruturas eram dinâmicas e capazes de aumentar em comprimento. Contudo, sabia-se que a enzima ADN polimerase apenas funcionava na direção 5' a 3', requerendo em simultâneo um *template* e *primer* para a síntese de ADN, o que por consequência deveria mostrar que estas terminações cromossomais ficariam progressivamente mais curtas ao longo de vários ciclos de replicação de ADN. O que se verificou, porém, foi a manutenção ou até aumento do comprimento dos cromossomas, levando a concluir que a replicação telomérica não seria apenas efetuada através da ação de enzimas de replicação do ADN convencionais, mas através da atividade de uma enzima distinta. Deste modo, estas duas investigadoras demonstraram a existência de uma enzima específica com atividade de transferase terminal, que adiciona repetições de uma sequência a terminações teloméricas do ADN, identificada inicialmente no protozoário *Tetrahymena thermophila*, posteriormente denominada de telomerase (41). De referir que, em trabalhos anteriores, Olovnikov havia já previsto a existência desta estrutura (36).

De acordo com o estado da arte, a enzima telomerase apresenta características distintas de outras enzimas, pois é a única enzima descoberta até ao momento, e presente especificamente em eucariotas, que apresenta atividade de transcriptase reversa, contrariando assim a senescência replicativa, o que permite uma potencial imortalidade das células (42).

Estes estudos sobre a descoberta da telomerase foram reconhecidos com a atribuição do Prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina, no ano de 2009, aos investigadores Carol Greider, Elizabeth Blackburn e Jack Szostak, evidenciando a relevância deste conhecimento para a comunidade científica.

3.2. Estrutura molecular

A telomerase, ou ARN telomerase, é uma holoenzima com atividade transcriptase reversa que adiciona repetições teloméricas TTAGGG à extremidade 3' de cromossomas lineares, o que permite manter a estabilidade do genoma, evitando que as extremidades cromossomais sejam reconhecidas e processadas como quebras de cadeias duplas de ADN. Esta corresponde a um

complexo ribonucleoproteico constituído por 2 subunidades principais distintas, a subunidade *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT), que apresenta atividade catalítica, e a subunidade *human telomerase RNA component* (hTERC) ou *human telomerase RNA* (hTR), que apresenta a sequência molde de ARN utilizada para o processo de alongamento das cadeias de ADN telomérico (41,42).

O complexo telomerase humana apresenta um tamanho de cerca de 550-650 quilodaltons (kDa), consideravelmente maior do que o tamanho originado pelas duas subunidades que constituem a composição essencial da enzima, hTERT e hTERC, com cerca de 289 kDa. Esta circunstância resulta da presença de outras estruturas associadas a estas, no complexo telomerase humana (43). De entre estas evidencia-se a associação de um complexo de ribonucleoproteína *Box H/ACA*, um complexo proteína-ARN que desempenha um papel essencial ao nível da montagem e estabilidade da telomerase, localização subcelular e função *in vivo*, formado por duas cópias/heterotetrâmeros das proteínas disquerina, *non-histone protein 2* (NHP2), *nucleolar protein 10* (NOP10) e *glycine/arginine-rich domain protein* (GAR1), e ainda uma proteína *telomerase cajal body 1* (TCAB1), as quais podem ser encontradas em vertebrados (42,44). A disquerina, a NHP2 e a NOP10 são relevantes para a estabilidade da estrutura do sítio ativo e para a regulação da subunidade hTERC *in vivo*, sendo necessárias para a síntese do complexo ribonucleoproteico da telomerase completo, com atividade catalítica ativa. A montagem desta enzima ocorre em estruturas denominadas de corpúsculos de Cajal, sendo que, após a mesma, a proteína TCAB1 é responsável pela sua localização subcelular (44–46).

A telomerase apresenta assim uma estrutura bilobada, formada por interações proteína-ARN e proteína-proteína que juntam ao todo 12 elementos proteicos e o hTERC, formando um lobo/núcleo catalítico e um lobo H/ACA, que se encontram ligados pela subunidade hTERC e por um dímero de histonas, H2A-H2B, como se encontra representado na Figura 3.1.

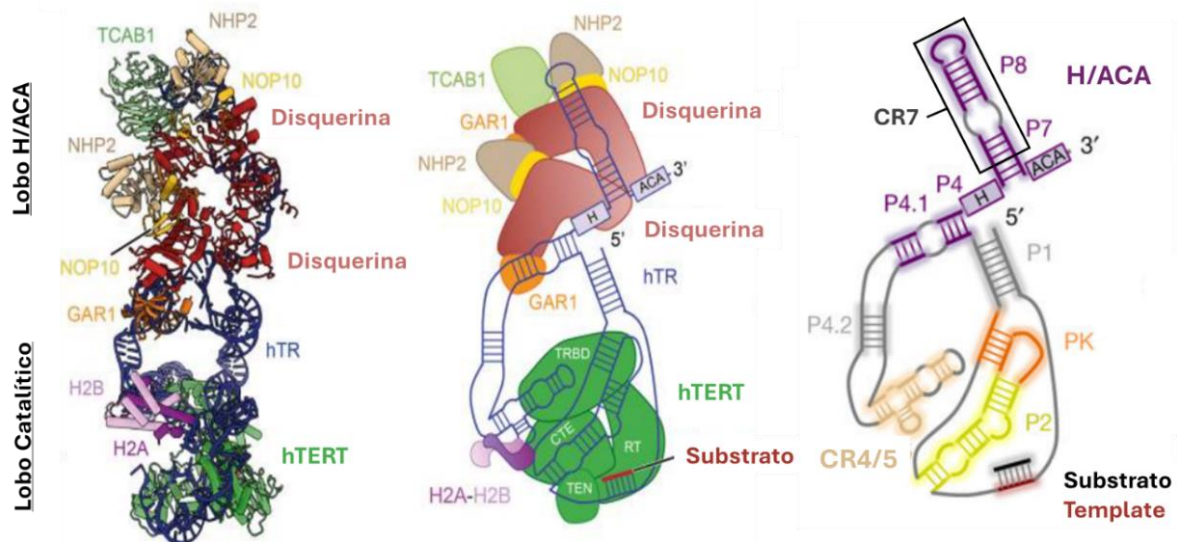


Figura 3.1 – Holoenzima telomerase humana, baseado na estrutura obtida por microscopia crioelétrica. Adaptado de (43) e (47).

O lobo/núcleo catalítico da telomerase é constituído pela subunidade hTERT, pelas histonas H2A-H2B e por dois domínios catalíticos essenciais da subunidade hTERC, o *pseudoknot/template* (PK/t) e as regiões conservadas 4 e 5 (CR 4/5) (47).

3.2.1. Subunidade hTERT

A subunidade hTERT é a responsável pela atividade catalítica da telomerase, sendo constituída por 4 domínios, formados por um total de 1132 aminoácidos, amplamente conservados nos diferentes eucariotas, nomeadamente um domínio N-terminal longo essencial da telomerase, ou *telomerase essential N-terminal* (TEN), um domínio de ligação ao ARN da telomerase, ou *telomerase RNA binding domain* (TRBD), um domínio central catalítico transcriptase reversa, ou *reverse transcriptase* (RT), e um domínio de extensão C-terminal curto, ou *C-terminal extension* (CTE). Estes domínios são requeridos para a ligação a ácidos nucleicos e nucleótidos do hTERC, assim como para a atividade catalítica propriamente dita (48,49).

O domínio TEN apresenta elevada afinidade de ligação com o ADN telomérico de cadeia simples e, por isso, é importante no recrutamento até aos telómeros, no reconhecimento e interação com o ADN substrato e no subsequente processo de alongamento. Os restantes domínios, TRBD, RT e CTE, formam uma estrutura em anel que aloja o *template* de RNA, sendo que o TRBD coopera na manutenção das interações hTERT-hTERC, de modo a otimizar o posicionamento da enzima junto do substrato e favorecer o processo de síntese telomérica.

Por sua vez, o domínio RT fornece o sítio catalítico, o qual contém duas regiões conectadas por um *loop*, considerando-se que estabelece contacto direto com o híbrido de ARN-ADN formado após a ligação do *template* como ADN telomérico, e com a extremidade 3' do ADN de cadeia simples no interior do sítio ativo da enzima. Foi também proposto que o domínio CTE contribui para a formação e estabilização do heteroduplex ARN-ADN no sítio ativo (43,50).

À semelhança de outras polimerases, o núcleo catalítico da telomerase é descrito como tendo a forma de uma mão direita, dividida em 2 subdomínios com estrutura semelhante aos “dedos” e à “palma”, que se encontram no domínio RT, e a um “polegar”, correspondente ao domínio CTE (42,50).

3.2.2. Subunidade hTERC

A subunidade hTERC ou hTR corresponde a uma cadeia de 451 nucleótidos de ARN essencial que forma o “esqueleto” da enzima e apresenta como principal importância incluir o *template* de ARN utilizado para o processo de alongamento telomérico. Esta região, conhecida por funcionar como *template* na síntese de novo ADN telomérico, apresenta carácter de cadeia simples, constituída por 11 nucleótidos, de sequência 5'CUAACCCUAAC3', das posições 46 à 56 desta subunidade (51).

Esta subunidade é também constituída por 4 domínios principais conservados, decorrentes da sua estrutura secundária, nomeadamente o domínio PK/t, que apresenta uma região *pseudoknot* que contém uma tripla-hélix essencial para a atividade da enzima, devido à sua importância no posicionamento da sequência *template* que se encontra adjacente. Apresenta também as CR4/5, que ligam o TRBD, a região conservada 7 (CR7) e a região da *box H/ACA*, que interage com as proteínas acessórias deste complexo de ribonucleoproteína, essenciais para a atividade da enzima *in vivo*, em que um dos heterotetrâmeros (disquerina, NHP2, NOP10 e GAR1) se liga à região de dupla cadeia P4 por meio da proteína disquerina, enquanto que o outro interage com a região P7, por meio da proteína disquerina, e CR7 por meio das proteínas NHP2 e NOP10, ligando também a proteína TCAB1, como representado na Figura 3.1 (42,52).

3.3. Biossíntese e mecanismos de regulação

Em condições normais, a telomerase é expressa constitutivamente em células estaminais embrionárias em desenvolvimento, as quais apresentam uma elevada taxa de divisão celular, estando posteriormente presente apenas em elevada taxa proliferativa ou em tecidos em renovação. Assim, a sua expressão encontra-se silenciada na maioria das células somáticas adultas diferenciadas, estando sujeita a uma extensa regulação, a qual se encontra dependente de variados mecanismos. Devido ao facto de a atividade da enzima se encontrar essencialmente associada às duas subunidades hTERT e hTERC, estas encontram-se sob controlo rigoroso, sendo de destacar a regulação ao nível da síntese e localização celular da subunidade hTERT, identificada como fator limitante na formação da telomerase funcional, sendo que esta apresenta menor estabilidade e menor tempo de semivida que a subunidade hTERC (53,54).

A síntese da telomerase humana divide-se essencialmente na síntese independente das subunidades hTERC e hTERT. No que diz respeito à expressão de ambos os genes, principalmente do hTERT, pensa-se que a mesma seja submetida a controlo não só pré e pós-transcrição como também pós-tradução, verificando-se inicialmente um controlo pré-transcrição mediado por vários mecanismos epigenéticos, incluindo modificações na estrutura da cromatina, metilação do ADN e das histonas, alterações/mutações ao nível do promotor do gene e ainda decorrentes da ligação de fatores de transcrição específicos, tais como TRF2 e a *specificity protein 1* (Sp1) (53–57).

À semelhança do que se verifica para o processo geral de transcrição celular, os genes hTERC, presente no cromossoma 3 humano, e hTERT, localizado no braço curto do cromossoma 5 humano, são transcritos por uma enzima RNA polimerase II no nucleoplasma, dando-se posteriormente o processamento de ambos os ARN mensageiros (ARNm) sintetizados, por meio de *splicing* alternativo, no qual é possível identificar mecanismos de controlo pós-transcrição, verificando-se também que a presença de variantes genéticas determina nessa etapa a síntese de uma enzima com atividade alterada ou ausente (53,57).

No caso do processamento do ARNm da hTERT, observa-se o envolvimento de múltiplos micro ácidos ribonucleicos (miARNs), que podem ter atividade de supressão ou estimulação da sua expressão. Esta etapa da biossíntese ocorre no núcleo, sendo posteriormente necessário o encaminhamento para o citoplasma celular, onde se dá o processo de tradução, com formação dos diferentes domínios dessa subunidade e posterior regresso novamente para o núcleo, onde se dá a sua montagem e permanência no nucleoplasma ou direcionamento temporário para os

nucléolos, identificando-se também esses processos de transporte como pontos críticos de regulação na atividade desta enzima (53,54). Esse transporte encontra-se muitas vezes dependente de processos de fosforilação desta subunidade (54).

Por outro lado, no caso do processamento do ARNm da subunidade hTERC destaca-se a ocorrência de uma extensa modificação química, nomeadamente a pseudouridilação do ARNm, assim como a inserção e remoção de uma cauda poli-A (3' oligo-adenosina) e da estrutura *cap* na extremidade 5', em que a presença dessas estruturas mostra regular negativamente a atividade da enzima e, por isso, englobam processos de regulação pós-transcrição críticos para a formação de um ARN telomérico maturo (53). Para que todo este processo seja efetuado de forma correta é necessária a presença do domínio H/ACA, o qual, como já referido anteriormente, se encontra envolvido na formação do complexo ribonucleoproteína, permitindo a ligação, em primeiro lugar, da proteína disquerina, e posterior inserção das restantes proteínas que formam os dois tetrâmeros, essenciais para a estabilidade do ARN da telomerase, inicialmente com a presença da *nuclear assembly factor 1 ribonucleoprotein* (NAF1), mais tarde substituída pela proteína GAR1, antes do transporte da estrutura formada do nucleoplasma principalmente para os corpos de Cajal, organelos não membranares envolvidos na maturação e processamento de ribonucleoproteínas localizados no núcleo de células eucariotas, ou em nucléolos, onde esta estrutura é armazenada. A presença desta subunidade nos corpos de Cajal é influenciado pela presença de subunidade hTERT disponível, constatando-se a entrada nestes organelos maioritariamente devido à presença da proteína TCAB1, aumentando o seu tempo de residência nessas estruturas nucleares (53,58).

O local de interação entre as duas subunidades ainda não está estabelecido, já que ambas se encontram em diferentes locais no interior do núcleo celular, porém acredita-se que envolva o transporte entre corpos de Cajal, nucléolos e nucleoplasma, e que esta interação seja auxiliada pela proteína chaperona Hsp90, envolvida na montagem da subunidade hTERT, na regulação do ciclo celular e na manutenção da integridade dos cromossomas (59). A mesma inicia-se por meio do TRBD com as CR4/5 e PK/t, e pelo domínio TEN com a região PK/t, moldando-o de modo a estabilizar a formação do duplex ARN-ADN na extremidade 3' do *template*, permitindo assim que a enzima se torne funcionalmente ativa. A posterior atividade da enzima encontra-se igualmente regulada por mecanismos ao nível dos telómeros, relacionados principalmente com a presença do complexo *Shelterin* e de proteínas como a *PIN2/TRF1-interacting telomerase inhibitor 1* (PinX1), a qual se liga diretamente à proteína TRF1, assim como às subunidades hTERT e hTERC, inibindo a atividade enzimática (54).

3.4. Mecanismo de ação

O recrutamento inicial da enzima e acesso da mesma à região dos telómeros ocorre, em condições normais, apenas durante a fase S do ciclo celular, encontrando-se altamente regulado e estritamente relacionado com o complexo *Shelterin*, referido no capítulo 2.1, o qual tem a função de proteção das extremidades de ADN telomérico. O seu principal componente, envolvido no recrutamento e interação com a telomerase, é a proteína TPP1, a qual permite a ancoragem da enzima ao local através do domínio TEN da subunidade hTERT. Por outro lado, a proteína TIN2 apresenta função essencial para o recrutamento da telomerase, assim como a proteína TRF1, que ao sofrer fosforilação se dissocia do telómero para permitir o “desenrolar” da estrutura em *T-loop*, a qual restringe o acesso da telomerase ao local da cadeia simples de ADN telomérico. No entanto, esta estrutura em *T-loop* necessita ainda de posterior desmontagem, sendo recrutada em simultâneo uma enzima com atividade helicase, *regulator of telomere elongation helicase 1* (RTEL1), que quebra essa estrutura, assim como os G4s, e contribui para a estabilização da cadeia simples (56,60).

Após a ligação entre a proteína TPP1 e o domínio TEN inicia-se a interação entre o *template* de ARN e o ADN telomérico substrato. O TRBD interage com o domínio RT, resultando na formação de uma estrutura terciária em forma de anel fechado que engloba uma cavidade no seu interior onde ocorre a colocação do *template* na posição correta, servindo de local de formação do duplex *template*-substrato (56). O pareamento entre bases inicia-se na extremidade 3' do *template* com a extremidade da cadeia de ADN rica em guaninas, dando-se da posição 46 à posição 50 da região *template*, e desencadeando posteriormente o processo catalítico de extensão do telómero em direção à extremidade 5', possibilitado pelos 6 últimos nucleótidos da região *template*, da posição 51 à 56, denominada de domínio de elongação (61). De seguida ocorre o desemparelhamento do duplex *template*-produto e, novamente, o reposicionamento da enzima, para permitir o pareamento da extremidade 3' do *template* com a extremidade sintetizada anteriormente, continuando de forma sucessiva a síntese da cadeia até que a mesma atinja o tamanho pretendido (60), processo esquematizado na Figura 3.2.

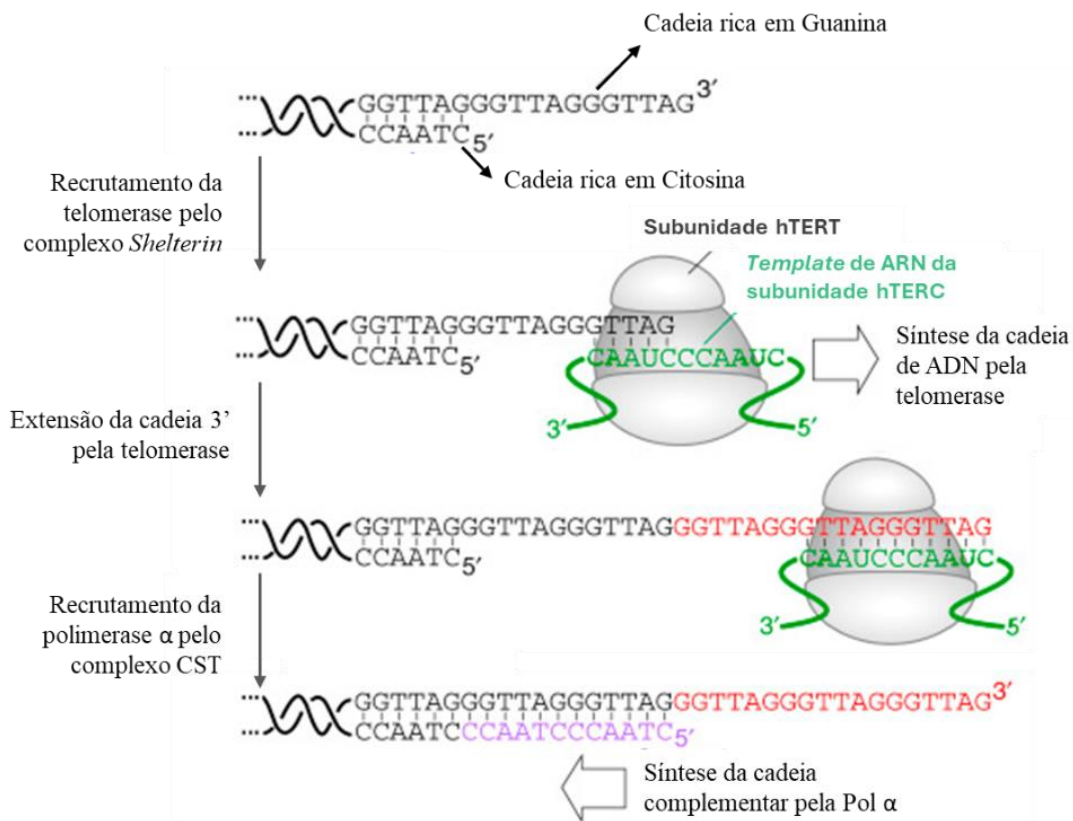


Figura 3.2 – Representação esquemática do recrutamento da telomerase e do processo de extensão das cadeias de ADN telomérico. *Adaptado de (62).*

Importa referir que é necessária a síntese da cadeia remanescente de ADN para a manutenção completa dos telómeros, de modo a formar a estrutura em cadeia dupla e, para tal, dá-se o recrutamento de um complexo CST-Pol α /Primase que confere uma atividade enzimática secundária, pela Polimerase α - Primase, responsável por efetuar o preenchimento da cadeia rica em citosina, complementar à anterior, prolongada pela atividade da telomerase. Todos estes processos garantem, por fim, a correta manutenção do tamanho e integridade do material genético (63).

4. O Papel da Telomerase na Carcinogénese

Como referido anteriormente, a maioria das células saudáveis não apresentam a telomerase funcional. No entanto, células com elevada capacidade proliferativa, como células da linhagem germinativa, células estaminais embrionárias e células de tecidos em renovação, apresentam esta enzima ativa, com capacidade de aumentar o comprimento dos telómeros, de modo a permitir, nestes casos, o potencial ampliado de multiplicação necessário, encontrando-se a sua atividade rigorosamente regulada. Neste contexto, possíveis disfunções na atividade da telomerase podem originar doenças, como a disqueratose congénita e anemia aplástica, sobretudo devidas à ausência de atividade ou atividade diminuída desta enzima (64). Contudo, as disfunções na telomerase apresentam um impacto mais significativo ao nível da carcinogénese, sendo que cerca de 90% dos tumores exibem telomerase funcional, tornando-a num dos marcadores tumorais mais comuns (65–67). Nestes casos, ocorre uma interrupção no rigoroso equilíbrio de regulação desta enzima, com o objetivo principal de garantir a manutenção do comprimento dos telómeros acima de um tamanho criticamente curto, impedindo o desencadeamento de mecanismos que levam a senescência celular ou apoptose (65), sendo o processo essencial para manter a divisão celular descontrolada característica deste tipo de células anormais.

4.1. Mecanismos de ativação

O pressuposto de que o encurtamento telomérico suprime o desenvolvimento tumoral suporta uma linha de investigação oncológica estabelecida, pelo desencadeamento de mecanismos de controlo celular. Todavia, o encurtamento dos telómeros pode originar instabilidade genética que, posteriormente, pode promover o processo de carcinogénese (67).

Embora podendo ocorrer, em alguns casos, em fases mais tardias da carcinogénese, a ativação da telomerase encontra-se frequentemente associada a uma disfunção telomérica originada em fases mais iniciais, denominando-se, neste caso, por ativação dependente de telómero. Esta disfunção telomérica é originada essencialmente pelo encurtamento dos telómeros, levando a instabilidade destas zonas terminais do material genético, que posteriormente desencadeia mecanismos de ativação da telomerase, essencialmente ao nível da expressão do gene hTERT, sendo fundamental para suprimir mecanismos de controlo e assim permitir a multiplicação celular, após já se encontrar bem estabelecida uma instabilidade genética nas células em

questão. Assim, os processos de encurtamento dos telómeros e ativação da telomerase são interdependentes na criação e manutenção da instabilidade genética, como representado na Figura 4.1, sendo este o principal fator envolvido na gênese e crescimento tumoral (67).

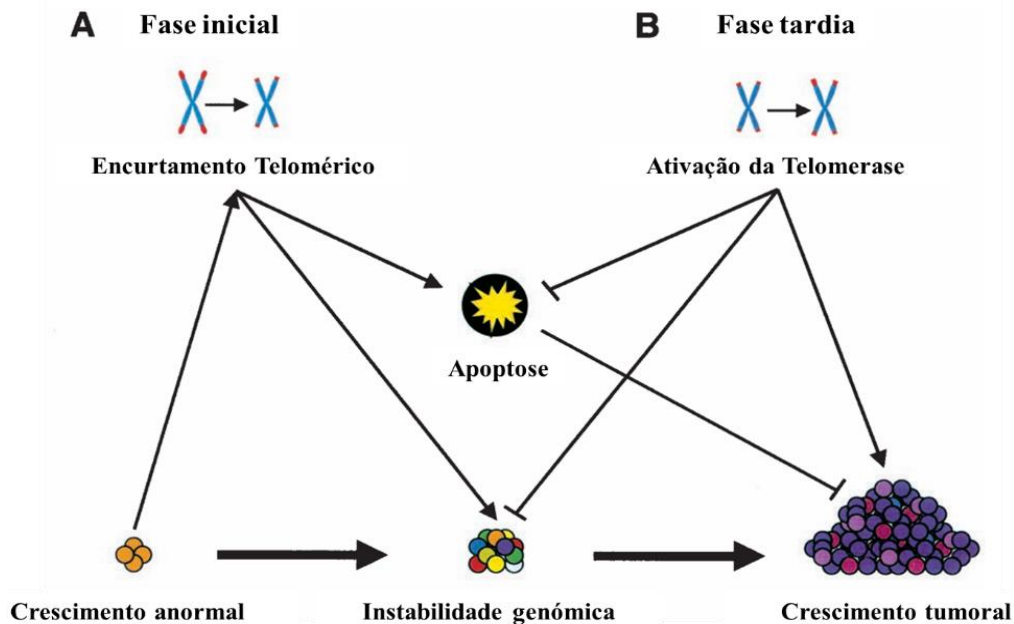


Figura 4.1 – Representação esquemática do papel da disfunção telomérica e ativação da telomerase no processo de gênese e progressão tumoral. *Adaptado de (67).*

No entanto, a ativação da telomerase pode ainda ser independente de telómero, associada maioritariamente a alterações genéticas ou epigenéticas que ocorrem em estágios precoces da carcinogénese, levando, neste caso, a uma ativação da telomerase numa fase mais inicial do processo (53). Estes mecanismos serão abordados em maior profundidade no tópico subsequente, que trata a regulação da expressão da telomerase no cancro.

Importa também salientar que nem sempre a telomerase é a responsável pelo processo de alongamento telomérico. Por vezes o encurtamento dos telómeros desencadeia mecanismos celulares independentes da telomerase, principalmente o mecanismo alternativo de alongamento do telómero, ou *alternative lengthening of telomere (ALT)*, que se baseia na síntese de ADN telomérico por recombinação e replicação intra e intertelomérica, verificando-se essencialmente a utilização da própria sequência telomérica de um telómero mais longo como *template* para o alongamento de um telómero que apresente tamanho mais curto. A ativação deste tipo de mecanismos encontra-se muito restrita a células tumorais que não

expressam hTERT funcional, ou nas quais a sua expressão se encontra reprimida, levando a comprimentos muito variáveis das diferentes regiões teloméricas cromossomais no material genético de cada célula tumoral (69).

4.2. Regulação da expressão

Como abordado no capítulo 3 desta dissertação, a telomerase é constituída por 2 subunidades fundamentais, a hTERT, responsável pela sua atividade catalítica, e a hTERC ou hTR, responsável por formar o “esqueleto” da enzima e apresentar o *template* de ARN utilizado no alongamento telomérico. Ao contrário da subunidade hTERC, que é expressa de forma abundante e ubíqua como um ARN longo não codificante (ARNlnc), a subunidade hTERT constitui o fator limitante na formação da enzima telomerase funcional, expressa apenas nas situações referidas e, por isso, apresenta o papel de componente-chave para a ativação desta enzima, principalmente no contexto da carcinogénese (68).

O gene que codifica para a componente hTERT da telomerase apresenta um comprimento de 42 quilobases (kb) e encontra-se localizado no cromossoma 5 (69). A regulação da sua expressão aparenta ser maioritariamente a nível transcricional (70). Em vários tipos de cancro, observa-se a existência de promotores mutantes do gene hTERT, decorrentes principalmente de rearranjos cromossómicos ou mutações de tipo *hotspot* (68,71,72). A própria disfunção telomérica pode promover a fusão das terminações cromossómicas, podendo ocorrer, em simultâneo, a inserção de promotores ativos próximos do gene hTERT, levando a uma maior expressão do mesmo (73). Por outro lado, mutações *hotspot* no gene hTERT são identificadas como as mais comuns em células cancerígenas humanas, encontrando-se documentada a sua presença na região codificante do gene, porém com maior frequência na região promotora, destacando-se as duas mutações C228T e C250T (73).

Estas alterações no promotor desencadeiam, por sua vez, novos locais de ligação a fatores de transcrição (68). Para além de mutações no gene hTERT, também se pode verificar, em alguns cancros, alteração em fatores de transcrição que, em condições normais, não regulam esse gene, mas que passam a induzir a sua transcrição. Um exemplo é a família Myc/Max/Mad1, que se encontra envolvida no comportamento celular, desempenhando funções importantes na proliferação, diferenciação, autorrenovação e morte celular (74). Em todos os casos, os fatores de transcrição ligam-se a sequências específicas do promotor e desempenham posteriormente

funções de recrutamento de outros fatores de transcrição adicionais, assim como enzimas modificadoras da cromatina, envolvidas em mecanismos epigenéticos e modulando a acessibilidade ao promotor do gene hTERT, o que facilita o acesso dos vários componentes envolvidos no processo de transcrição, como é o caso da enzima ARN polimerase, e permite assim a sua função, possibilitando o aumento da expressão genética (53).

É relevante também referir a importância das modificações epigenéticas ao nível da região não codificante do gene hTERT, sendo a metilação do promotor um elemento essencial na regulação da expressão genética. É de destacar uma região conhecida como *TERT hypermethylated oncological region* (THOR), presente especificamente em células tumorais com elevada expressão hTERT e localizada numa região mais distante da região codificante relativamente ao promotor central. Esta região hipermetilada atua como ativadora da transcrição, ao contrário do promotor central, que nestes casos se encontra não metilado para permitir a ligação de fatores de transcrição (73).

O fator de transcrição Myc, resultante da expressão do proto-oncogene *celular myelocytomatosis* (c-Myc), é um fator da família Myc/Max/Mad1, tendo sido o primeiro oncogene celular identificado com função ativadora da telomerase (71). Apresenta uma elevada importância no processo de carcinogénese na maioria dos cancros, envolvendo-se na convergência de múltiplas vias de sinalização, tais como a expressão do gene hTERT, em resposta a sinais celulares e ambientais específicos. Este é regulado positivamente por outros fatores, como o *nuclear factor κB* (NF-κB), que também apresenta zona de ligação ao promotor hTERT e, por isso, assim como o fator Myc, estimula diretamente a expressão deste gene. Outros fatores de transcrição que podem estar envolvidos na sobre-expressão do gene hTERT incluem proteínas da família *E26 transformation-specific* (ETS) e proteínas *signal transducer and activator of transcription* (STAT), nomeadamente a STAT3 (53).

Posteriormente, a nível pós-transcricional, destaca-se um extenso *splicing* alternativo do ARNm, regulado por muitos dos efetores de sinalização que controlam a transcrição deste gene. Decorrente deste *splicing* pode ocorrer a formação de diversas variantes, podendo mobilizar vários mecanismos que dotam células com fenótipos malignos. É de notar que algumas variantes que não apresentam atividade catalítica podem, em contrapartida, estimular a proliferação celular (53).

Após o processamento do ARNm, diferentes miARNs têm sido descritos como importantes reguladores da expressão do hTERT, principalmente por regularem negativamente a mesma.

Estes miARNs ligam-se diretamente à região 3'UTR, interferindo com o processo de tradução. Estes podem também atuar indiretamente ao nível dos fatores de transcrição, nomeadamente como reguladores negativos do proto-oncogene c-Myc. Desta forma, observa-se na maioria dos casos que a atividade destes miARNs é diminuída, ou até inibida, em células tumorais (72).

Posteriormente, podem ainda estar envolvidas modificações pós-traducionais que alteram as propriedades físico-químicas da proteína, desencadeando uma alteração da sua conformação espacial e, conseqüentemente, do seu grau de atividade, localização celular e interações com outras proteínas. Estas modificações ocorrem devido à adição de grupos químicos a um ou mais resíduos de aminoácidos da proteína, destacando-se a fosforilação por diferentes cinases, dependendo muito do tipo de célula e de cancro (68).

Relativamente aos restantes componentes que formam a enzima ativa, muito pouco se sabe acerca da regulação da sua expressão em células tumorais. Contudo, é de referir que muitos desses componentes não apresentam apenas funções associadas à homeostase do telómero. A sua expressão pode ser regulada de forma menos rigorosa, ou podem apresentar mecanismos de controlo de expressão diferentes dos envolvidos na síntese de hTERT (53).

Foi observado que o estado de hipoxia celular, característico de muitos tumores, aumenta a atividade da telomerase, podendo o aumento estar relacionado com a ativação do sinal da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (68).

Para além dos mecanismos referidos, a atividade da telomerase também é regulada através da atividade de moduladores específicos que influenciam a montagem da enzima, sendo que reguladores positivos, neste caso, promovem uma maior atividade da enzima, como é o caso da proteína *nuclear VCP-like 2* (NVL2) e da proteína *even shorter telomeres 1* (EST1) (68).

4.3. Funções extra-teloméricas do domínio hTERT

A ativação da telomerase é essencial na maioria dos diversos tipos de cancro, pois permite a progressão maligna de células, assim como a sua imortalização. A telomerase contribui ao nível do alongamento das regiões teloméricas, como referido anteriormente, mas pode também desempenhar outras funções, as quais podem ser agrupadas em duas categorias: as que envolvem a atividade da telomerase, mas não o alongamento dos telómeros; as que não envolvem a atividade da telomerase nem o alongamento dos telómeros (53,73).

Foi demonstrado que, em alguns casos, ocorre uma sobre-expressão do componente hTERT durante a carcinogénese sem se verificar, em simultâneo, um aumento da atividade da telomerase, o que indica que este componente, independente da telomerase, possui outro tipo de funções ao nível das células cancerígenas (53). Foi também reportada a correlação entre elevados níveis de expressão de hTERT e um estado mais avançado da doença, com prognóstico mais desfavorável (75). Estudos demonstraram que o componente hTERT interage também com outros fatores, incluindo o NF- κ B, o Myc, a Sp1, o *Brahma-related gene 1* (BRG1), e a helicase PIF1, influenciando a expressão de vários genes e a transdução de sinal em várias cascatas de sinalização intracelulares. Estas contribuem principalmente para a proliferação e regulação de mecanismos metabólicos essenciais, promovendo a manutenção do microambiente tumoral, incluindo mecanismos de angiogénese e vascularização, pela associação ao *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mecanismos com efeitos ao nível do tecido mesenquimal, promovendo a transição de tecido epitelial a mesenquimal das células tumorais, ou seja, o desenvolvimento tumoral, atuando por indução da expressão de genes induzida pelo proto-oncogene *cellular mesenchymal-epithelial transition* (c-MET), e ainda ao nível de fatores inflamatórios e da resposta imune, pela associação ao NF- κ B, que atua como fator de transcrição pró-inflamatório, estimulando a progressão do cancro (68). A componente hTERT também mostra, em alguns casos, atividade promotora da via Wnt/ β -catenina, estimulando a transcrição de genes envolvidos na proliferação, renovação e sobrevivência celular (76).

Os dois componentes da telomerase, sobretudo a hTERT, podem também ser encontrados na mitocôndria, desempenhando um papel regulatório deste organelo. O domínio hTERT, quando sobre-expresso, pode controlar indiretamente a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), o que potencia a sobrevivência de células tumorais em ambientes de *stress* (77). Também foi associado ao favorecimento de resistências a quimioterapias, por originar, em geral, um aumento da atividade mitocondrial, melhorando a capacidade da célula de produzir energia. Pode ainda estabilizar os telómeros através de um mecanismo *cap*, independente do alongamento telomérico (78), e promover a migração e adesão celular, estimulando cumulativamente o processo de metastização do tumor (79).

Na Figura 4.2 encontram-se descritos estes mecanismos independentes do alongamento telomérico que a componente hTERT medeia em células tumorais.

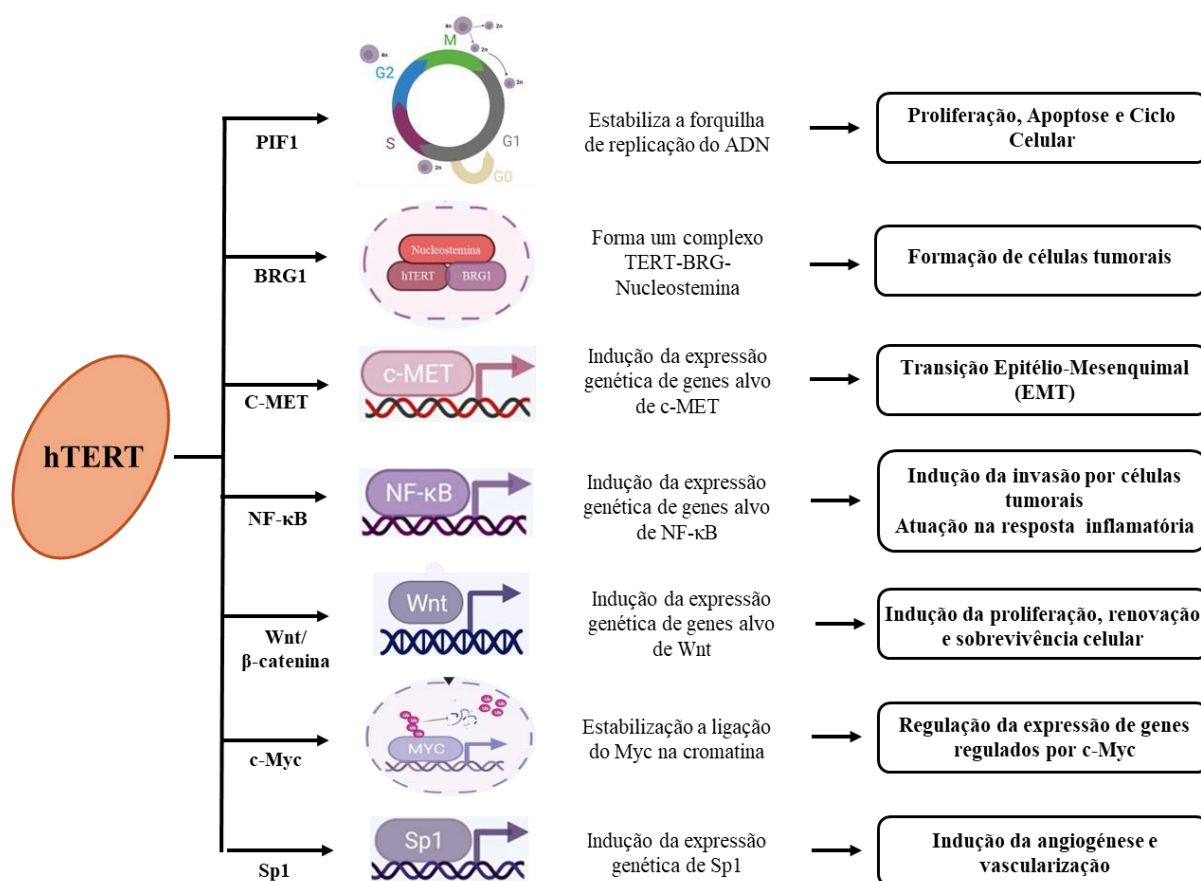


Figura 4.2 – Representação das funções não canónicas da componente hTERT na carcinogénese. Adaptado de (68) e (76).

A componente hTR é expressa de forma constitutiva em células somáticas e até ao momento não foram demonstradas funções extra-teloméricas desta componente. No entanto foram reportadas evidências do seu envolvimento na regulação da expressão genética, por interação com regiões promotoras de genes Wnt, genes alvo Myc, genes relacionados com a via de sinalização NF-κB e também genes envolvidos no processo de mielopoiese, um processo de produção de células da linhagem mieloide a partir de células hematopoiéticas progenitoras, ao nível da medula óssea (77).

Foi demonstrado que ambas as componentes da telomerase estão envolvidas em mecanismos de proteção celular, nomeadamente em mecanismos de resposta a lesões no ADN, pela influência na fosforilação da histona γH2AX e na autofosforilação da ATM, principalmente pela componente hTERT, e também na regulação da atividade da ATR pela componente hTR, a qual aumenta a sobrevivência de células T em condições de apoptose (77,80).

4.4. Neoplasias associadas a elevada atividade da Telomerase

A atividade da telomerase é regulada de forma positiva na maioria das malignidades, sendo mais elevada em tumores avançados e metásticos (81), nomeadamente em células de cancro da mama, do pulmão, de cancros do trato gastrointestinal, como o cancro do esófago, do estômago e do cólon, de cancros que afetam o trato urinário, como o cancro do rim e da bexiga, de cancros em órgãos do sistema reprodutor, maioritariamente o cancro do útero, do ovário, e da próstata, de cancro do pâncreas, de cancros de células estaminais, de síndromes mielodisplásicas ou neoplasias hematológicas, e de cancros que envolvem células do sistema imunitário. Para além dos referidos, também se destacam o carcinoma hepatocelular, o melanoma primário, os cancros de tecidos moles, ou sarcomas de tecidos moles, que se podem desenvolver em músculo, nervos, vasos sanguíneos e tecido adiposo (lipossarcomas), os osteossarcomas, e ainda alguns tumores cerebrais, como glioblastoma e neuroblastoma (82–84). A ativação e regulação da expressão da telomerase nos diversos tipos de cancros referidos ocorre por mecanismos distintos, encontrando-se muito associada a fenótipos mutantes, pois deriva, na maior parte dos casos, principalmente de fatores genéticos (84).

O cancro da mama, identificado como o mais comum nas mulheres em todo o mundo, é um dos tipos de cancro onde mais se verifica uma expressão aumentada da telomerase. Entre 75 e 90% de carcinomas *in situ* apresentam expressão hTERT, correspondendo essa expressão a cerca de 90% em cancros da mama invasivos. Adicionalmente, verifica-se uma correspondência significativa entre a elevada expressão hTERT e a ocorrência de doença recorrente (85,86).

A exacerbação da atividade da telomerase tem sido demonstrada igualmente em cancro do pulmão, nomeadamente em cancro de células pequenas, um dos primeiros tipos de tumor em que foi identificada a presença desta enzima ativa, no ano de 1995 (87). Esta atividade enzimática verifica-se em cerca de 90 a 100% dos casos de cancro de células pequenas, sendo mais baixa em cancro de células não pequenas. É observada exacerbação da atividade em 62 a 94% dos casos, num conjunto de tumores que inclui carcinoma espinocelular, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes do pulmão, assim como sarcoma pulmonar e mesotelioma. Nestes tumores, a identificação de sobre-expressão da telomerase também se encontra correlacionada com um pior prognóstico e, por consequência, com menor taxa de sobrevivência (85).

Relativamente a cancros do sistema digestivo, destaca-se o cancro do estômago e cancro do cólon e reto. A expressão hTERT é, na maioria dos casos, muito abundante em cancros gastrointestinais, encontrando-se na maioria das vezes associada a estágios avançados da

doença ou até metástases peritoneais (88). No cancro do cólon e reto, verifica-se a expressão elevada de hTERT em carcinoma colorretal em cerca de 81% dos casos de cancro esporádico, no entanto é de referir que a própria mucosa intestinal normal pode apresentar expressão da telomerase, sendo de esperar assim que nestes casos permaneça ou se torne ativa, porém em níveis muito mais elevados (85,88).

Em cancros de órgãos do trato urinário, carcinomas uroteliais, como o cancro do rim e cancro da bexiga, também se verifica elevada expressão da telomerase. O cancro da bexiga é o tipo de cancro mais comum do trato urinário (89). A atividade da telomerase e expressão hTERT é detetada em cerca de 90% dos casos, no entanto, este é um dos casos raros em que a sua presença não indica necessariamente malignidade (85).

O cancro do útero e o cancro do ovário também apresentam telomerase ativa em quase todos os casos. No caso do útero, em situações normais já se verifica alguma atividade telomérica durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, nas células do endométrio, posteriormente suprimida na fase secretória. Assim, nestes casos a elevada atividade da telomerase não está necessariamente associada a mutações condutoras (90). No caso de situações malignas, é o carcinoma cervical que mostra apresentar com maior predominância a presença de telomerase funcional e sobre-expressa. As neoplasias epiteliais do ovário também se caracterizam por apresentar elevada expressão de telomerase, contudo em apenas cerca de 60% dos casos de tumores do ovário com baixo potencial maligno, e em 40% de cistadenomas do ovário (85).

O cancro pancreático, em particular o adenocarcinoma ductal pancreático, conhecido pelo seu comportamento agressivo e prognóstico reservado, é também um tipo de cancro associado a elevada atividade da telomerase. Neste, a presença da telomerase ativa é evidente em cerca de 95% dos casos, correlacionando-se com características histológicas mais agressivas e uma rápida progressão da doença, assim como a resistências aos tratamentos convencionais (91).

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) são referidas atualmente como um grupo de cancros caracterizados por uma produção anormal de células sanguíneas ao nível da medula óssea, processo de hematopoiese, distinguindo-se por estados de anemia, neutropenia e trombocitopenia, que podem posteriormente progredir a leucemia mieloide aguda (92). As células estaminais hematopoiéticas, ou células progenitoras presentes na medula óssea, têm como principal característica a sua elevada taxa de divisão por longos períodos, apresentando maior probabilidade de acumular defeitos genéticos, o que, conseqüentemente, leva a maior predisposição a malignidades. Estes tipos de células, em situações normais, demonstram

apresentar telomerase ativa, o que leva a que este tipo de neoplasias se encontre muito associado à presença de uma elevada expressão telomérica, a qual aumenta progressivamente à medida que as células adquirem características mais malignas (93).

Estas SMDs englobam 4 tipos clássicos de neoplasias mieloproliferativas que, segundo a OMS, incluem a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primária (MFP), assim como a policitemia vera (PV) e a leucemia mieloide crónica (LMC). A etiologia concreta deste grupo de patologias ainda não se encontra completamente determinada, no entanto é conhecido que se encontram relacionadas com uma mutação genética no gene que codifica para a *Janus cinase 2* (JAK2), uma enzima pertencente à família de *Janus cinases*, cinases de tirosina importantes em mais de 50 processos de sinalização celular que envolvem a resposta à ação de diversas citocinas e recetores hormonais, participando no processo de transdução de sinal (94).

Por outro lado, células do sistema imunitário, nomeadamente linfócitos, tanto B como T, também apresentam naturalmente alguma atividade da telomerase. Consequentemente, durante o processo de carcinogénese que envolve estas células observa-se um elevado envolvimento da enzima telomerase, frequentemente associado a um aumento significativo da sua expressão. Assim, patologias como linfomas não-Hodgkin e leucemias de células B destacam-se por apresentarem níveis particularmente elevados de atividade da telomerase (95).

No melanoma maligno, a sobre-expressão da telomerase encontra-se associada a melanoma com mutação BRAF V600, demonstrando um prognóstico bastante desfavorável. Este relaciona-se com uma maior taxa de metástase precoce e baixa sobrevida dos pacientes (69).

Em células de sarcomas verifica-se uma expressão da telomerase mais baixa, comparativamente a células de carcinomas, sendo que muitos sarcomas apresentam mecanismos de alongamento dos telómeros independentes da atividade da telomerase, mais especificamente o mecanismo ALT. A deteção da telomerase neste tipo de tumores malignos de tecidos moles varia entre cerca de 10 a 86% dos casos, enquanto em tumores malignos do osso varia entre cerca de 11 a 58%. Importa referir que o nível de expressão da telomerase varia bastante entre diferentes subtipos de sarcomas, dependendo das suas características, sendo a presença de telomerase ativa associada a um pior prognóstico da doença (85).

Os tumores cerebrais são considerados como os que apresentam maior taxa de mortalidade associada. O glioblastoma é o tumor cerebral maligno mais comum, verificando-se sobre-expressão da telomerase em cerca de 80% dos casos e sendo a presença de mutações no promotor hTERT de elevada relevância para o estabelecimento do prognóstico. No

neuroblastoma, caracterizado como um tumor sólido comum na infância, a ativação da telomerase também se encontra fortemente associada a um fenótipo mais agressivo, embora existam casos em que o alongamento telomérico é efetuado por mecanismos independentes da telomerase, nomeadamente o mecanismo ALT (96).

Como referido anteriormente, a evidência experimental revela expressão aumentada da telomerase na maioria dos cancros, apontando para o papel crucial desta enzima na carcinogénese, não apenas por permitir o alongamento dos telómeros e, assim, a imortalização, mas também pelas funções extra-teloméricas que desempenha, conferindo às células tumorais vantagens proliferativas, nomeadamente de evasão imunitária, de resistências a fármacos e de maior capacidade metastática, o que resulta num maior grau de malignidade e em pior prognóstico da doença. Neste cenário, foi considerada a utilização da telomerase como biomarcador na deteção de alguns cancros, em fases iniciais. No entanto, o interesse principal da telomerase está associado ao seu elevado potencial como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade anticancerígena, que possam ser usadas em vários tipos de cancros (85,91). Este aspeto tem sido alvo de crescente investigação e será o principal foco a ser explorado nos capítulos seguintes.

5. A Telomerase como Alvo Terapêutico

A associação entre a tumorigênese e a atividade da telomerase, bem como a subsequente hipótese de que a inibição desta enzima poderia constituir uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do cancro, emergiu no final do século XX, com o trabalho de Calvin Harley *et al.* (97), publicado em 1994. Em 1995, Junli Feng *et al.* (51), estudaram a componente hTR da telomerase em células HeLa e obtiveram resultados positivos para a inibição da atividade da telomerase, observando a diminuição do crescimento celular em células que apresentavam expressão de oligonucleótidos antissenso, e assim comprovando experimentalmente a hipótese de Calvin Harley *et al.*

Desde então, o potencial terapêutico da inibição da telomerase tem sido a área de maior foco em estudos envolvendo a telomerase (98), e o desenvolvimento de estratégias para modular a sua atividade tornou-se um dos principais temas na investigação oncológica, pelo seu potencial de inibir seletivamente células tumorais e também pelo desafio de preservar células normais, principalmente as de elevada capacidade proliferativa, como células estaminais e linfócitos. Os estudos realizados ao longo dos últimos 30 anos têm contribuído para uma compreensão mais aprofundada da holoenzima telomerase enquanto alvo terapêutico, explorando os mecanismos possíveis de inibição, que se têm revelado cada vez mais diversificados, e também a viabilidade da sua aplicação clínica, nas vertentes da eficácia e da segurança.

5.1. Estratégias na modelação da atividade da telomerase

Até ao momento foram considerados e explorados vários métodos potenciais de inibição da telomerase que foram divididos, de forma simplificada, em abordagens diretas e indiretas, tendo em conta o mecanismo de ação envolvido. No entanto a inovação tecnológica permitiu a diversificação de estratégias, algumas das quais já não se enquadram estritamente nas categorias clássicas, constituindo grupos distintos que apresentam mecanismos de ação inovadores.

5.1.1. Abordagens diretas

As estratégias de abordagem direta no design de inibidores da telomerase englobam o uso de moléculas que bloqueiam diretamente a atividade da enzima, através da inibição específica de uma das suas componentes, a de ARN, hTR, ou a componente catalítica, hTERT. Deste tipo de

abordagem resultou o desenvolvimento de pequenas moléculas de carácter não nucleosídico que se comportam como inibidores diretos da componente catalítica hTERC, assim como compostos sintéticos derivados ou análogos de ácidos nucleicos, destacando-se os oligonucleótidos antissenso, projetados para reconhecer e neutralizar especificamente a componente hTR da telomerase (99).

5.1.2. Abordagens indiretas

As estratégias de abordagem indireta envolvem outros mecanismos de ação, complementares à regulação da atividade da enzima, sem inibição direta da sua estrutura enzimática. De entre estes mecanismos destaca-se a inibição da expressão genética da componente hTERC, regulada a nível celular, sendo esta estratégia denominada como terapia direcionada ao gene da telomerase. A estabilização das estruturas em G4 também é um exemplo deste tipo de abordagem, baseando-se na utilização de compostos estabilizadores destas estruturas presentes nas terminações teloméricas, o que impede a ação da telomerase. A utilização de oligonucleótidos homólogos de telómero, ou T-oligos, também é considerada uma abordagem indireta, caracterizando-se pela utilização de moléculas com estrutura semelhante aos telómeros e que podem atuar por mais de um mecanismo de ação, promovendo o desencadeamento final de mecanismos de senescência celular (99).

A inibição indireta da telomerase pode também ser alcançada através da modulação do funcionamento de proteínas associadas a vias de sinalização intracelulares que desempenham um papel importante na proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular de células tumorais, indiretamente ligadas ao funcionamento da telomerase, tais como a Wnt/ β -catenina e a MAPK. Alterações que interferem na correta manutenção do microambiente celular também surgem como fator determinante, com possibilidade de afetarem o funcionamento da telomerase. Um exemplo são alterações no pH, alcançáveis através da modulação da atividade da enzima anidrase carbónica. Esta enzima desempenha um papel crucial em células tumorais, pois permite a manutenção de um pH intracelular favorável à sobrevivência e proliferação celular, em condições de elevado metabolismo celular, caracterizado pela elevada produção de acidez metabólica (100). A alteração da atividade desta enzima também pode desregular a atividade da telomerase, afetando a sua estabilidade. A alteração do normal funcionamento de proteínas envolvidas no complexo *Shelterin* também pode ter um impacto elevado na atividade

da telomerase, ao nível dos telómeros, já que estas proteínas apresentam um papel fundamental na proteção e normal manutenção destes (83,99).

5.1.3. Abordagens mais recentes

Outras estratégias emergentes de inibição da telomerase, que não se enquadram nas divisões clássicas descritas anteriormente, têm sido alvo de estudo. De entre as mais relevantes destaca-se a imunoterapia antitelomerase.

A imunoterapia antitelomerase apresenta como princípio a manipulação do sistema imunitário do hospedeiro, de modo a atacar as células cancerígenas, as quais expressam, neste caso, a componente hTERT. Esta abordagem pode basear-se no contexto estratégico de vacina, através da utilização de estruturas peptídicas ou fragmentos de ADN como antígenos, administrados no organismo, ou ainda em abordagens mais recentes de terapia imunogénica celular, que envolvem a utilização de células apresentadoras de antígenos (APCs), ou de células T manipuladas por tecnologias de edição genética CRISPR/Cas9 (101), de modo a aumentar a capacidade de deteção e eliminação pelo sistema imunitário de células cancerígenas que apresentam expressão da telomerase (83,99).

Para além destas abordagens, tem vindo a ser explorado o desenvolvimento de partículas virais modificadas, ou vírus oncolíticos, com especificamente para células alvo que expressam a telomerase.

Uma abordagem quimioterápica que se tem mostrado promissora ao nível da eficácia é a utilização de terapias combinadas, baseadas na associação de mais do que um fármaco, com mecanismos de ação diferentes, mas atuando sinergicamente para uma inibição mais eficiente da atividade da telomerase, com o foco principal na destruição de células cancerígenas (99).

As abordagens em desenvolvimento partilham o objetivo principal de induzir a senescência ou morte celular seletiva em células tumorais dependentes da atividade da telomerase para a sua sobrevivência. Nos capítulos seguintes serão exploradas em maior detalhe as principais classes de compostos em desenvolvimento com propriedades como agentes inibidores da telomerase.

5.2. Principais classes de inibidores da telomerase

Na seguinte Figura 5.1 encontram-se representadas as diferentes estratégias terapêuticas de modelação da atividade da telomerase e entidades envolvidas com potencial atividade inibidora desta enzima, abordadas anteriormente de forma resumida. Nesta secção abordaremos com mais detalhe as várias classes de estruturas moleculares responsáveis pelo processo de inibição.

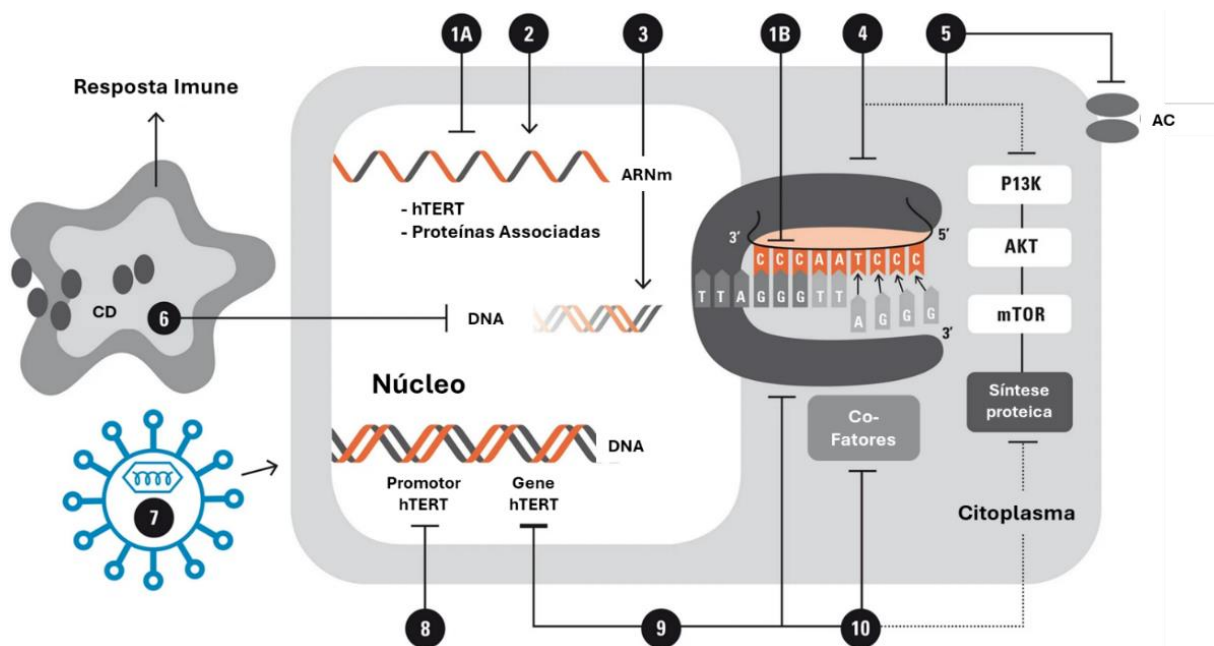


Figura 5.1 – Diferentes estratégias terapêuticas anticancerígenas baseadas na telomerase. *Adaptado de (83).*

1. Oligonucleótidos antissenso do ARNm do gene hTERT (1A); oligonucleótidos antissenso da região template de hTR (1B)
2. Indutores de variantes inativas no splicing alternativo
3. Estabilizadores de G4
4. Pequenas moléculas inibidoras diretas não nucleosídicas
5. Inibidores híbridos duplos, com inibição da telomerase e da anidrase carbónica
6. Abordagens imunoterapêuticas
7. Utilização de vetores virais para reparo mutacional ou terapia oncolítica
8. Terapia genética direcionada ao promotor da telomerase
9. Moléculas fitoquímicas e outras substâncias com uma ampla gama de mecanismos
10. Modulação da atividade de proteínas do complexo *Shelterin*

5.2.1. Moléculas sintéticas derivadas de ácidos nucleicos

5.2.1.1. Oligonucleótidos Antissenso

De entre as moléculas sintéticas derivadas de ácidos nucleicos com atividade inibidora da telomerase destacam-se os oligonucleótidos antissenso. Estes correspondem a pequenas sequências sintéticas de ADN ou ARN, quimicamente modificadas, em que a estrutura base se encontra representada na Figura 5.2. São compostos normalmente por 15 a 22 bases nucleotídicas e podem apresentar variados mecanismos de ação a nível celular, baseados na sua ligação complementar a uma região específica de uma molécula de ARN alvo, tendo como objetivo principal modular ou bloquear a sua função. Podem ser usados para inibir a atividade da telomerase de diversas formas, tanto de modo direto como de modo indireto, dependendo do ARN alvo (102).

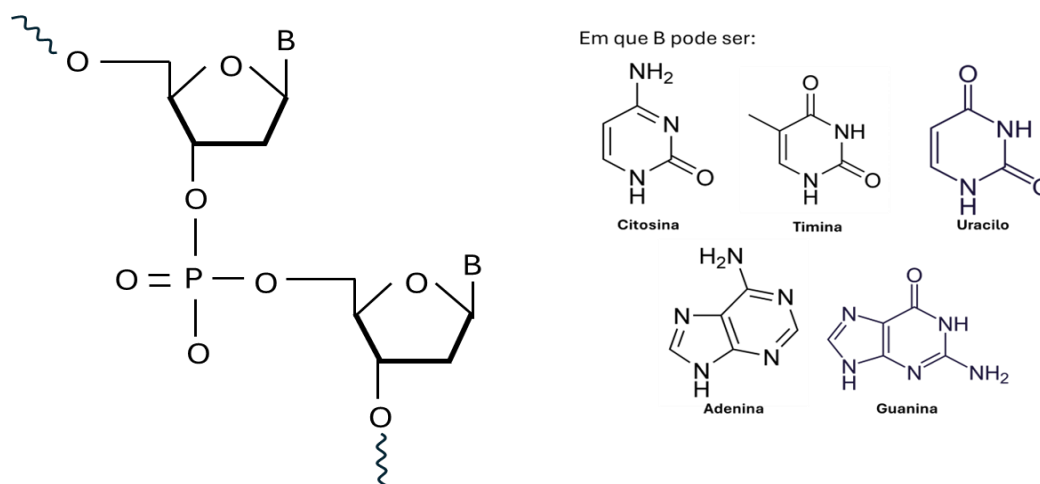


Figura 5.2 – Representação da estrutura base de uma molécula oligonucleotídica (a letra B corresponde à respetiva base azotada).

Os oligonucleótidos antissenso podem apresentar uma atividade inibitória direta da telomerase quando têm como alvo a região *template* da componente hTR. Neste caso, interagem com esta região e competem na sua ligação ao ADN telomérico, com conseqüente inibição da atividade catalítica da enzima (103,104). Este tipo de moléculas inibidoras pode também interferir, numa fase mais precoce, com a montagem da sequência de ARN da componente hTR, induzindo a sua degradação ou a alteração da sua localização a nível celular (104). Este mecanismo promove

uma inibição rápida do crescimento de células cancerígenas, permitindo assim um tempo de latência mais baixo quando comparado com a maioria das abordagens indiretas (98).

O composto originalmente conhecido como GRN163L, atualmente denominado de Imetelstat, é um exemplo de um oligonucleótido antissenso que se liga à região *template* da componente hTR (99). Este composto é constituído por uma sequência tiofosforamidato 13-mer N3'-P5', de 13 oligonucleótidos sintéticos, com substituição de átomos de oxigénio do grupo fosfato dos nucleótidos por átomos de enxofre, ligada covalentemente a uma molécula de ácido palmítico na extremidade 5' por meio de um fragmento de aminoglicerol, formando um grupo palmitoílo. A estrutura em cadeia de nucleótidos modificados introduz resistência contra as nucleases celulares, o que melhora a sua estabilidade, tanto em tecidos como no plasma, bem como a sua afinidade para ligação ao alvo. O grupo lipídico permite aumentar a permeabilidade celular ao composto, facilitando a sua entrada nas células, o que aumenta consequentemente a sua potência e contribui para melhorar o seu perfil farmacocinético e também farmacodinâmico. A sua ligação ao *template* de ARN da componente hTR resulta numa inibição direta e competitiva da telomerase (81,105,106). A estrutura simplificada do composto GRN163L encontra-se representada na Figura 5.3.

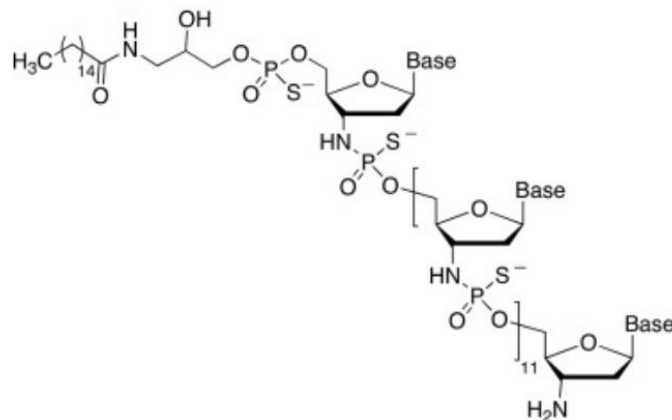


Figura 5.3 – Representação da estrutura química do Imetelstat. *Adaptado de (105).*

Uma das etapas limitantes da ativação celular da telomerase corresponde à expressão do gene da componente hTERT. Os oligonucleótidos antissenso podem, por outro lado, ser direcionados ao ARNm precursor ou ao ARNm processado do gene hTERT, ou de outras proteínas

envolvidas na atividade da telomerase, inibindo a sua expressão e consequente a síntese proteica, sendo esta uma abordagem inibitória indireta da telomerase. A ligação destas moléculas ao ARNm origina a sua inativação, restringindo a presença da componente catalítica a nível celular (83,102).

Esta técnica de redução da expressão do transcrito pode também ser conseguida através da utilização de outros tipos de moléculas derivadas de ácidos nucleicos, destacando-se pequenas moléculas de ARN de interferência (ARNsi), que correspondem a pequenas moléculas de ARN de cadeia dupla, principalmente usadas para silenciamento do gene hTERT ou inibição da atividade da componente hTR. Ao serem incorporadas nas células, as moléculas associam-se ao complexo indutor de silenciamento por ARN (RISC), promovendo a degradação de cadeias de ARN específico (98,107,108). Foram também desenvolvidas ribozimas autocatalíticas de cadeia simples de ARN, ou ribozimas *hammerhead*. São enzimas de ARN que clivam ligações entre ácidos nucleicos específicos, capazes de hidrolisar ligações fosfodiéster, que podem ser direcionadas à clivagem de zonas específicas conservadas da cadeia de ARN, neste caso da componente hTR, promovendo a degradação deste domínio (98,108). Até ao momento, apesar de já existirem algumas moléculas com estas características aprovadas para o tratamento de algumas patologias, nenhuma em específico se revelou promissora como inibidora da telomerase para terapia anticancerígena, o que se deve principalmente a limitações farmacocinéticas, nomeadamente dificuldades na sua entrega ou direcionamento específico para células tumorais, baixo tempo de permanência no organismo e indução de respostas imunitárias indesejadas, indicando a necessidade de estudos de otimização.

5.2.1.2. Oligonucleótidos homólogos de telómero

Os oligonucleótidos homólogos de telómero, também conhecidos como *T-oligos*, correspondem a oligonucleótidos com uma estrutura em sequência homóloga à da extremidade saliente 3' do telómero humano, constituído por várias repetições da sequência 5'-TTAGGG-3' (102). A nível intracelular, estas moléculas inibem indiretamente a atividade da telomerase, através da simulação da extremidade teloméricas desprotegida, desencadeando a ativação de mecanismos de resposta a lesões no ADN. No entanto, esta ação pode ocorrer segundo dois mecanismos distintos. Num deles, designado por modelo do mimetismo do telómero exposto, estas moléculas simulam a presença a nível nuclear da extremidade telomérica desprotegida, desencadeando por si só mecanismos de resposta a lesões no ADN. No outro, designado por

modelo de dissociação do complexo *Shelterin*, as moléculas promovem a dissociação de algumas proteínas do complexo *Shelterin* das regiões teloméricas para estas moléculas homólogas, levando à exposição das zonas teloméricas reais, por alteração da sua estrutura secundária, o que leva à ativação de mecanismos que culminam na morte celular (104,109).

Um composto de destaque nesta classe é o T11, um oligonucleótido específico constituído por 11 bases, composto pela sequência 5'-dGTTAGGGTTAG-3' (109).

5.2.1.3. Tiopurinas

As tiopurinas são derivadas da base nitrogenada purínica, caracterizadas pela presença de um átomo de enxofre na posição 6. A estrutura da molécula 6-tioguanina, o composto parente das tiopurinas, está representada na Figura 5.4. Estes compostos exibem estruturas semelhantes a nucleótidos, que são reconhecidos pelas células e incorporados na síntese de ADN ou ARN. A alteração na estrutura da cadeia simples origina uma modificação estrutural na sequência sintetizada, inibindo consequentemente a sua síntese de ácidos nucleicos. A 6-mercaptopurina e o seu pró-fármaco, a azatioprina, convertido a nível intracelular em 6-tioguanina, são os exemplos mais conhecidos desta classe de fármacos. São utilizados principalmente como imunossuppressores em diversas patologias, como é o caso da doença inflamatória intestinal. A 6-mercaptopurina é usada no tratamento da leucemia aguda (110).

As telomerasas apresentam elevada afinidade por bases que contêm 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato, já que estas estruturas são essenciais na elongação dos telómeros. Assim, análogos destas estruturas foram avaliados como inibidores potenciais da atividade das telomerasas. Um exemplo é o composto 6-tioguanina-2'-desoxiguanosina (6-thio-dG), também conhecido como *THIO* ou Ateganosina, cuja estrutura está representada na Figura 5.4. Este composto é incorporado no ADN telomérico durante a síntese do telómero pela telomerase, danificando a cadeia, o que origina uma falha na replicação e, por consequência, desencadeia mecanismos que terminam na senescência celular (110).

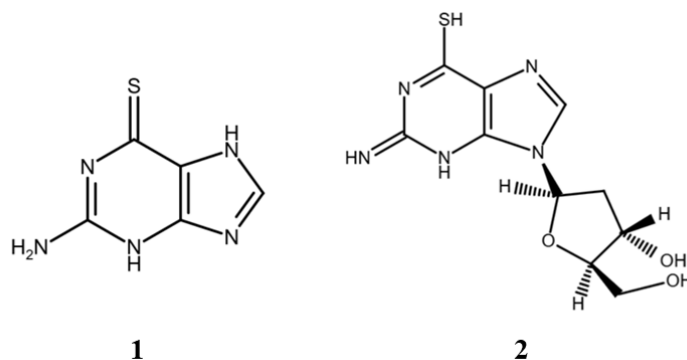


Figura 5.4 – Representação das estruturas químicas dos inibidores nucleosídicos tiopurínicos 6-tioguanina (1) e 6-tioguanina-2'-desoxiguanosina (6-thio-dG) (2), esta conhecida como THIO.

5.2.2. Pequenas moléculas não nucleosídicas

Em quimioterapia, a designação “molécula pequena” é atribuída a compostos orgânicos de peso molecular inferior a 1000 Dalton. Já foram identificadas várias moléculas pequenas com atividade como inibidores da telomerase, com recurso à utilização de bases de dados deste tipo de substâncias e também através da síntese de derivados ou análogos de alguns compostos naturais com atividade demonstrada como inibidores da telomerase. As moléculas podem atuar por diversos mecanismos, tais como a inibição direta ou a estabilização da estrutura G4 (111).

5.2.2.1. Inibidores diretos

Uma das abordagens de inibição da telomerase envolve a utilização de moléculas que inibem a subunidade catalítica por interferência direta na sua estrutura ou função, podendo atuar também na diminuição da expressão de hTERT (111). De entre estes inibidores destaca-se a 3-galato-epigallocatequina (EGCG), um polifenol natural bioativo extraído do chá verde (*Camellia sinensis*), representado na Figura 5.5, que atua pela diminuição da expressão do gene hTERT. Estudos do modo de ação deste composto revelaram a sua interação com diversos alvos celulares envolvidos na regulação do ciclo celular e na indução da apoptose, entre os quais a inibição específica da telomerase. Contudo, os mecanismos de interação que provocam a inibição da telomerase ainda não são conhecidos. Há, no entanto, evidências de que a sua metabolização, por auto-oxidação, forma um radical galoílo localizado no grupo galato, o qual apresenta capacidade de modificar covalentemente a telomerase (112,113).

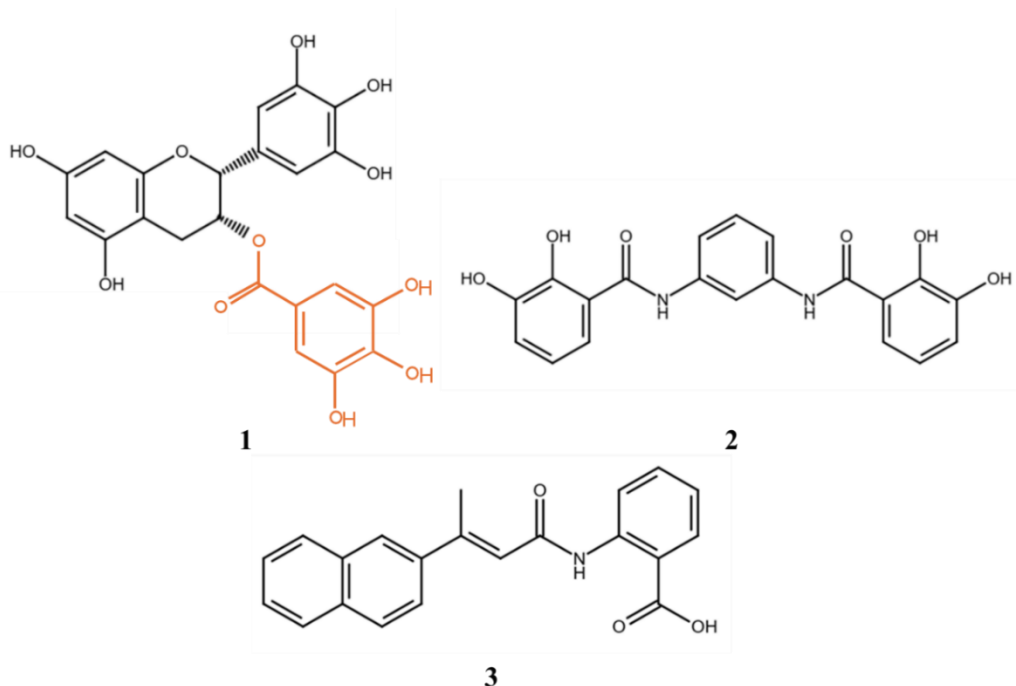


Figura 5.5 – Representação das estruturas químicas da 3-galato-epigallocatequina (EGCG) (1), com o grupo galato destacado a laranja, do seu derivado, o composto MST-312 (2), e do composto BIBR-1532 (3).

Um composto derivado da EGCG é o MST-312, cuja estrutura está representada na Figura 5.5. O MST-312 apresenta também atividade inibidora seletiva da telomerase, com um perfil mais estável que EGCG e potência superior. Este composto inibe a telomerase, comprometendo o crescimento de células tumorais e estimula a apoptose através da indução de danos no ADN telomérico, ativação da resposta a lesões no mesmo e inibição da via NF- κ B (111,114).

O composto BIBR-1532, cuja estrutura está representada na Figura 5.5, destaca-se como outro exemplo de pequena molécula sintética inibidora seletiva da componente hTERT. A evidência existente indica que este composto se liga diretamente à componente hTERT da telomerase numa bolsa hidrofóbica, na superfície externa do domínio CTE da hTERT, mais comumente conhecido como “polegar”, impedindo a ligação entre as componentes hTERT e hTR, a interação entre “polegar” e TRBD às CR4/5 do hTR, o que inibe a montagem completa desta ribonucleoproteína, comprometendo a sua atividade (115). Para além de inibidor direto da atividade da telomerase, o BIBR-1532 também foi identificado como indutor negativo da expressão genética da componente hTERT, o que reforça o seu poder inibitório, através de mecanismos distintos e sinérgicos (116).

O composto BIBR-1532 foi desenvolvido com base na semelhança da telomerase com a transcriptase reversa, presente em retrovírus, tanto a nível estrutural como funcional (83,110). Atualmente é conhecido por apresentar um perfil farmacocinético pobre, com fragilidades ao nível da internalização pelas células alvo e toxicidade moderada, características que limita a sua aplicabilidade clínica (83,99). Vários derivados ou análogos têm sido estudados com o fito de desenvolver moléculas que possam ultrapassar essas limitações e possibilitando o desenvolvimento deste quimiotipo farmacofórico para terapia anticancerígena (117,118).

5.2.2.2. Inibidores que atuam por estabilização de G-quadruplex

O desenho e desenvolvimento de estabilizadores de estruturas G4 tem suscitado muito interesse no contexto da terapia anticancerígena. Os esforços conduziram a várias moléculas pequenas com atividade indireta de inibição da telomerase através da estabilização de G4s. Estas estruturas podem ser encontradas tanto ao nível dos telómeros como em regiões promotoras de alguns genes, como é o caso de vários oncogenes e também do gene hTERT, estando envolvidas em diversos processos celulares, nomeadamente com atividade repressora da transcrição de genes e, de principal foco neste contexto, ao nível dos telómeros, como proteção das regiões terminais a danos no ADN e, conseqüentemente, ativação de mecanismos celulares decorrentes dessas lesões, o que torna a estrutura G4 como alvo de interesse no desenvolvimento de moléculas para terapia anticancerígena. A inibição da telomerase decorrente da atividade destes compostos apresenta carácter indireto, tanto na sua ação ao nível dos telómeros, impedindo o desenrolar destas estruturas e, deste modo, o acesso da enzima aos telómeros, como também pelo bloqueio principal da ligação de fatores de transcrição ao promotor do gene hTERT, diminuindo a sua taxa de transcrição (119). Este tipo de compostos apresenta um efeito antiproliferativo muito mais rápido que outros inibidores seletivos da telomerase, não explicado pela inibição da telomerase, mas sim por outro tipo de mecanismos de ação, como a deslocação de proteínas do complexo *Shelterin*, e indução de fusões cromossómicas, levando ao desencadeamento de mecanismos de resposta ao dano do ADN muito mais rapidamente e sem ser necessário um desgaste inicial dos telómeros (120).

Os compostos inicialmente identificados com efeito estabilizador de G4s são de origem natural e permitiram identificar os tipos de interação necessárias para o desenho de fármacos com este

modo de ação. O primeiro composto identificado como ligando G4 foi a bisamidoantraquinona, representada na Figura 5.6 (121).

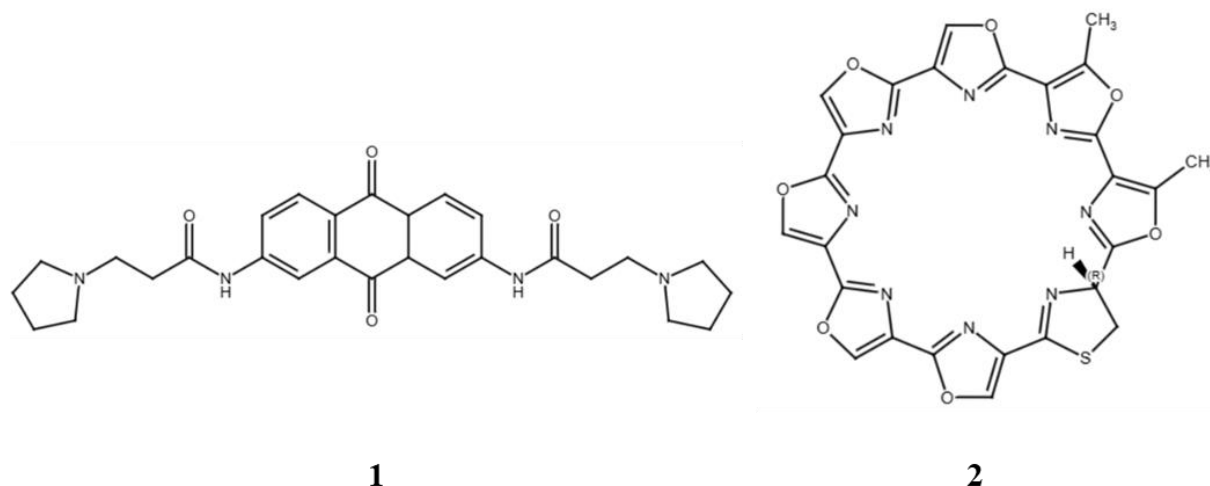


Figura 5.6 – Representação da estrutura química de uma bisamidoantraquinona com efeito estabilizador de estruturas G-quadruplex (1), e da Telomestatina (2).

A telomestatina, representada na Figura 5.6, é um composto macrocíclico natural isolado da bactéria *Streptomyces anulatus 3533-SV4*. Atua principalmente pela indução da formação de G4s na região telomérica, impedindo a atividade da telomerase ao nível dos telómeros (83). No entanto, como consequência dessa interação ocorre uma desestruturação do complexo *Shelterin*, pela dissociação das proteínas POT1 e TRF2, promovendo um efeito secundário de degradação destas terminações e ativação de respostas de lesão no ADN, que culminam na supressão da proliferação celular (122).

A descoberta dos metabolitos acima referidos inspirou o desenvolvimento de diversos compostos sintéticos de modo a ajustar as características farmacológicas deste tipo de inibidores. Alguns dos compostos revelaram-se promissores em relação à sua potencial utilização na terapêutica anticancerígena (116). Os estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que, de modo a apresentar carácter estabilizador de G4, conduzindo à inibição eficaz da telomerase, a estrutura deste tipo de compostos deve incorporar uma zona aromática ou heteroaromática planar, mas com substituintes que confiram alguma flexibilidade à molécula, possibilitando a formação de pontes de hidrogénio na região interna. É importante a presença de um núcleo aromático ou heteroaromático que permita a formação de interações π -

π com as estruturas G4s, assim como uma ou mais cadeias laterais que permitam interações eletrostáticas com a estrutura desoxirribose-fosfato do ADN. Para além destas características, deve ainda ser possível a formação de pontes de hidrogénio com moléculas de água ou, alternativamente, deve ser possível sequestrar um catião K^+ monovalente presente no centro do poro iónico dos G4s, de modo a bloquear a superfície plana da molécula no interior do alvo e facilitar assim a sua interação com o mesmo (121,123).

Um composto sintético desenhado com o objetivo de apresentar as características ótimas para estabilização de G4s, referidas anteriormente, foi a Piridostatina. A estrutura deste inibidor está representada na Figura 5.7, evidenciando os tipos de interação com o alvo. A Piridostatina, tal como os restantes compostos desta família, apresenta atividade estabilizadora de G4s e, como consequência, induz a disfunção telomérica pela competição com a ligação de proteínas do complexo *Shelterin* ao telómero, nomeadamente a POT1 (123).

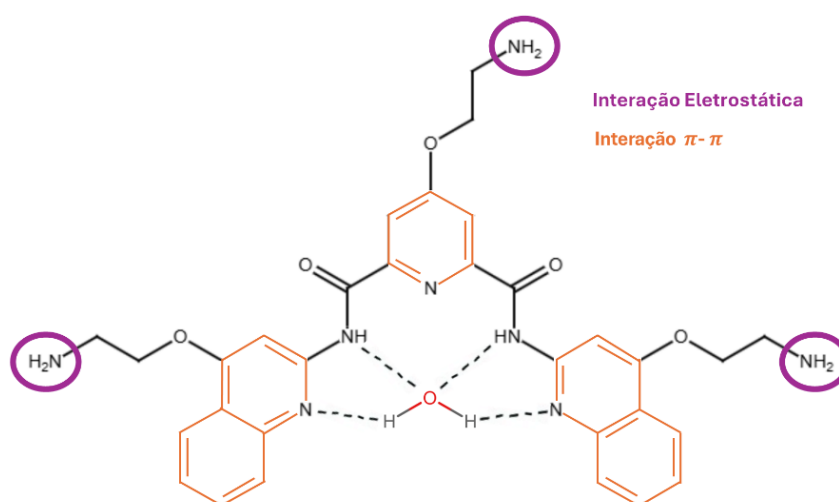


Figura 5.7 – Representação da estrutura química da Piridostatina, com indicação dos tipos de interação formadas com o alvo. *Adaptado de (123).*

A partir dos compostos referidos foram sintetizados diversos outros, que evidenciaram elevado potencial inibitório da telomerase através deste mecanismo de ação. De entre eles destacam-se os derivados tricíclicos de acridina com estrutura linear, BRACO-19, AS1410 e BSU6037, e um derivado pentacíclico da acridina, o composto RHPS4, representados na Figura 5.8 (83,119).

De entre os estabilizadores de G4s, o composto BRACO-19 (figura 5.8) é dos inibidores da telomerase mais estudados, sendo considerado um dos mais eficazes e com maior especificidade para as estruturas em G4s. É um derivado tri-substituído de acridina, desenhado de modo a interagir com 3 domínios da estrutura G4 e, deste modo, apresenta uma maior atividade inibitória da telomerase, quando comparada com a do composto que inspirou o seu design, a bisamidoantraquinona. Interage assimetricamente com bases de guanina da estrutura G4 por meio de interações π - π , ocorrendo em simultâneo uma interação iónica entre o fosfato da cadeia de ADN, carregado negativamente, e as cadeias laterais da molécula do inibidor, carregadas positivamente, assim como um alinhamento central com catiões K^+ que se podem encontrar no interior do poro iónico, no centro da estrutura em G4. Esta ligação impede a atividade catalítica da telomerase e também instabiliza o complexo *Shelterin*, como efeito secundário, tal como observado com outros compostos desta classe (124,125).

O BRACO-19 é um composto de destaque, principalmente quando comparado com inibidores diretos da componente hTERT, pois apresenta capacidade de produzir efeitos antitumorais mais rápidos, após o início do tratamento (124). Contudo este composto apresenta toxicidade significativa, o que limita a sua possível utilização em contexto clínico (126).

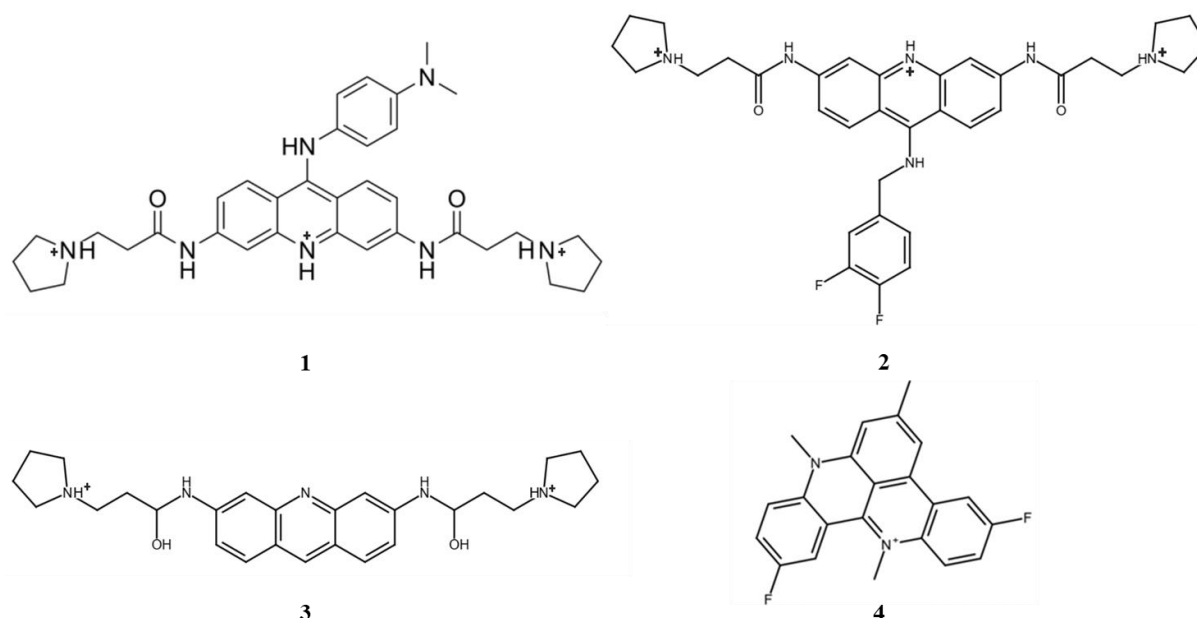


Figura 5.8 – Representações estruturais dos derivados tricíclicos de acridina com estrutura linear, BRACO-19 (1), AS1410 (2) e BSU6037 (3), e com estrutura pentacíclica, RHPS4 (4).

O composto AS1410 é um derivado do BRACO-19, apresentando como modificação estrutural um grupo difluorobenzilamina na posição 9 que lhe confere um maior carácter lipofílico e um tempo de semivida plasmática superior. No entanto este composto continua a demonstrar elevada toxicidade (126). A sua estrutura encontra-se representada na figura 5.8.

Tal como os compostos BRACO-19 e AS1410, o composto BSU6037, representado na figura 5.8, é também um derivado da acridina, incorporando dois substituintes. O mecanismo de ação deste composto permanece em investigação, contudo as evidências são indicativas de que seja muito semelhante ao do BRACO-19. O composto BSU6037 tem capacidade para intercalar totalmente na interface quadruplex-duplex, a região onde a estrutura G4 se liga diretamente à região de dupla-hélice do ADN (duplex), enquanto que no BRACO-19 a intercalação é apenas parcial (127). Esta especificidade confere um maior poder inibitório ao composto BSU6037, o que justifica a sua elevada relevância farmacológica, contudo o desenvolvimento deste candidato a fármaco ainda se encontra numa fase muito inicial (127).

O composto RHPS4, representado na figura 5.8, também exhibe o fragmento acridina, contudo a molécula apresenta uma estrutura diferente pois o núcleo de acridina encontra-se fundido com mais dois anéis formando uma estrutura pentacíclica rígida, o que lhe confere uma maior superfície aromática para intercalação nas estruturas em G4s, permitindo uma elevada capacidade estabilizadora destas estruturas, assim como capacidade de desestruturação de proteínas do complexo *Shelterin* (128). O composto RHPS4 é um potente inibidor da telomerase, no entanto apresenta baixa seletividade, exibindo efeitos em células não alvo e, por consequência, uma elevada toxicidade (126).

Outros compostos com este tipo de atividade são o CX-3543, mais conhecido por quarfloxina, um fármaco da classe das fluoroquinolonas com atividade estabilizadora de G4, a partir do qual foi desenvolvido posteriormente o composto CX-5461, ou pidnarulex. As estruturas destes compostos estão representadas na figura 5.9. O pidnarulex apresenta diversos mecanismos de ação, associando a inibição da telomerase com a inibição da enzima topoisomerase II. O composto estabiliza as estruturas em G4s, evidenciando também, em alguns tipos de células tumorais, nomeadamente de gliomas, uma atividade ao nível do processo de *splicing* alternativo de hTERT, tendo sido demonstrado que a inibição da telomerase resulta também do estímulo à formação de transcritos inativos (119,129,130). O pidnarulex é considerado um composto bastante promissor no contexto de terapêutica anticancerígena (119).

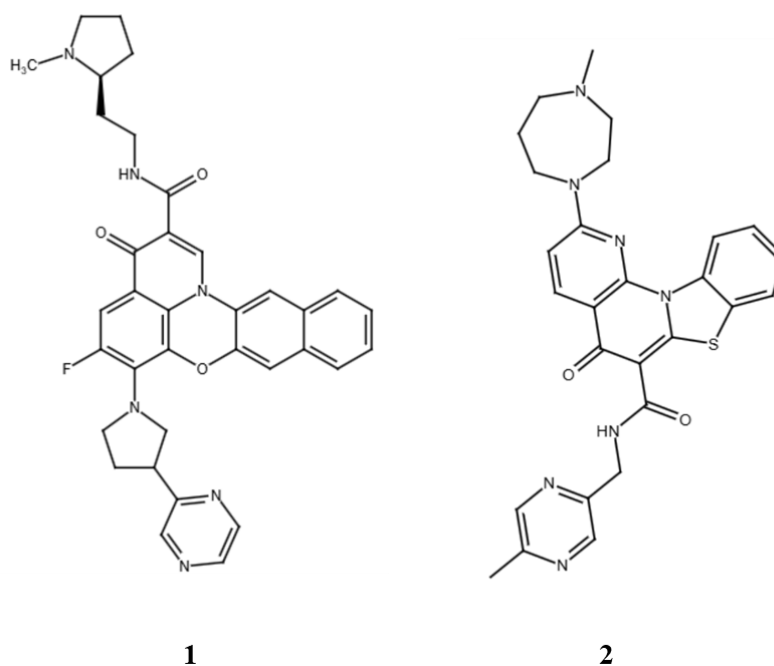


Figura 5.9 – Representação das estruturas químicas da Quarfloxina (1) e do Pidnarulex (2).

Outro tipo de estabilizadores G4s são compostos com estrutura de base porfirínica, como é o exemplo do TMPyP4, representado na figura 5.10. Este composto apresenta uma estrutura tetrapirrólica com substituintes piridilo metilados, exibindo quatro cargas positivas na estrutura. A molécula tem capacidade para intercalar eficazmente nas estruturas em G4. Estes compostos atuam de modo semelhante aos referidos anteriormente, via interações π - π através do seu núcleo aromático tetrapirrólico, e também formando interações eletrostáticas entre as posições catiónicas dos substituintes metilpiridinium e os grupos fosfato, negativos, da cadeia de ADN. O composto TMPyP4 é inibidor potente da telomerase, mas demonstra uma baixa seletividade para o alvo pretendido. Contudo, pode vir a ser de grande importância como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos de base porfirínica otimizados (131).

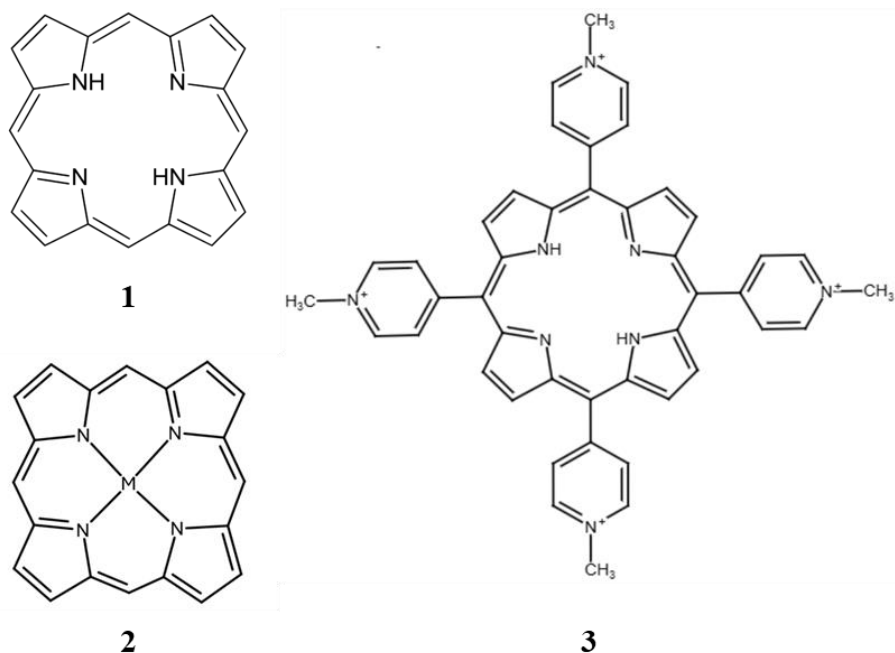


Figura 5.10 – Representação da estrutura química base das porfirinas (1), da estrutura química base das metaloporfirinas (letra M representa o átomo de metal) (2), e do composto TMPyP4 (3).

Alguns complexos metalo-orgânicos, que apresentam um centro metálico, têm vindo a ser explorados pela atividade inibidora da telomerase, devido à sua estrutura ideal para interação com G4s e inibição da atividade desta enzima (83). Estes apresentam, de forma resumida, a capacidade de estabilizar, ou até induzir, a formação de G4s, o que leva a uma inibição eficaz da atividade catalítica da telomerase sobre a extremidade dos telómeros, apresentando também propriedades redox que podem induzir lesões ao nível dos telómeros. Os macrociclos tetrapirrólicos característicos das porfirinas podem incorporar na estrutura um centro metálico, complexando cátions metálicos de ruténio, platina, manganês, ferro, cobre, ou níquel (132). A estrutura de base das metaloporfirinas está representada na figura 5.10 (133).

Alguns derivados das metaloporfirinas têm sido explorados relativamente à sua capacidade como ligandos e estabilizadores de G4s, destacando-se nos estudos as metaloftalocianinas e os metalocorroles. Outros tipos de complexos metálicos têm, à semelhança dos anteriores, demonstrado atividade estabilizadora de G4s, tais como complexos metálicos de Salens, complexos metal-fenantrolina, complexos metal-terpiridina, complexos de ruténio octaédricos e também complexos dimetálicos e conjuntos metálicos multinucleares (132). Apesar do potencial destas estruturas no contexto da quimioterapia anticancerígena, estas investigações são recentes e os resultados apenas preliminares, requerendo um maior investimento.

5.2.3. Imunoterapia antitelomerase

Em 2018, o prémio Nobel da Fisiologia ou Medicina, atribuído a James Allison e Tasuku Honjo devido aos seus trabalhos envolvendo as respostas imunitárias e a sua aplicação na terapêutica do cancro, destacou o potencial da imunoterapia anticancerígena (81). A telomerase foi identificada como um alvo muito atraente no desenvolvimento deste tipo de terapias, já que durante a sua degradação proteossomal, a nível intracelular, os seus fragmentos peptídicos originados são expressos à superfície celular de células tumorais como um antígeno, reconhecido por linfócitos T citotóxicos (CD8+), desencadeando, por fim, um ataque do sistema imune a estas células (81,134).

Atualmente, para além dos agentes quimioterapêuticos que atuam como inibidores da telomerase desenha-se a imunoterapia antitelomerase, outro tipo de abordagem antitelomerase digna de destaque devido ao seu carácter promissor na terapêutica anticancerígena, e que tem sido alvo de muitos avanços recentemente, visando o desenvolvimento de vacinas. O racional baseia-se na existência de uma expressão relativamente elevada e seletiva de telomerase em células de alguns tipos de cancro, e pela observação de que os linfócitos T, principalmente citotóxicos, apresentam antígenos alvo derivados da telomerase, permitindo o direcionamento da morte celular deste tipo de células anormais mediada pelo sistema imunitário do indivíduo, através da estimulação de células T CD8+ e/ou CD4+, dependendo do tipo de vacina (119).

Existem alguns tipos de vacinas direcionadas à telomerase que, de acordo com a sua composição, podem ser classificadas como vacinas de ADN, ou ARN, ou vacinas peptídicas (135). As vacinas de ADN introduzem material genético num organismo, neste caso ADN, de modo a promover uma resposta imunitária do mesmo. Estas vacinas apresentam a vantagem de poder incluir até múltiplos genes que codificam para antígenos tumorais completos ou parciais, destacando-se as vacinas de ADN do gene hTERT, que funcionam como um antígeno reconhecido por células T específicas da componente catalítica hTERT.

Um exemplo deste tipo de vacinas de ADN é a INVAC-1. Esta vacina é composta por um plasmídeo de ADN que codifica uma proteína hTERT alterada, sem atividade funcional, em que o terminal N da proteína se encontra modificado por uma unidade de ubiquitina, o qual força a sua degradação e aumenta a sua apresentação no organismo como antígeno, levando a um aumento na resposta imunitária específica a células que expressam a componente hTERT,

determinada tanto por células T *helper*, CD4⁺, como por células T citotóxicas, CD8⁺, o que confere uma resposta imunitária antitumoral elevada (135,136).

Tal como a INVAC-1, as vacinas INO-1400 e INO-1401, compostas por um plasmídeo que codifica, entre outras proteínas, principalmente a hTERT, contendo mutações imunogénicas, promovem a indução de respostas imunes celulares no organismo (137,138).

Outro tipo de vacinas são as peptídicas, constituídas por fragmentos peptídicos derivados de regiões específicas da holoenzima telomerase, que são reconhecidos no organismo e desencadeiam mecanismos de estimulação da resposta imunitária. Um exemplo deste tipo de vacinas é a UV1, constituída por três fragmentos peptídicos sintéticos longos e distintos da proteína hTERT, representando 54 aminoácidos presentes no centro ativo da hTERT na sua composição, capazes de induzir uma resposta específica por parte das células T contra células que apresentem expressão da telomerase (119). Outro exemplo é a UCPVax, composta por dois fragmentos peptídicos, denominados UCPs, ou *universal cancer peptides*, derivados da componente hTERT, com capacidade de induzir células T *helper* (CD4⁺). À semelhança da UCPVax, também foram desenvolvidas a vacina Vx-001, composta por dois fragmentos peptídicos da proteína hTERT, e a GX301, composta por 4 fragmentos (119).

Uma outra vacina composta por fragmentos peptídicos, que apresenta uma elevada relevância, é a GV1001, também conhecida como Riavaxtm ou Tertomotide. Esta é constituída por um fragmento de 16 aminoácidos derivado da subunidade hTERT (119,135), com capacidade para induzir resposta não só por parte das células T *helper* (CD4⁺) mas também de células T citotóxicas (CD8⁺) (139).

Existem ainda outros tipos de vacinas, como é o caso da *Peptide-Nucleotide Dual Vaccine* (PNDV). Esta vacina é constituída por um fragmento peptídico associado a uma sequência de ADN, neste caso por uma variante de epítipo de baixa afinidade acoplada ao gene total hTERT, encapsulados numa partícula semelhante a vírus, apresentando capacidade para induzir uma resposta imune sobre células que expressam hTERT (135).

Outras abordagens terapêuticas imunológicas baseadas na utilização de células dendríticas modificadas têm sido também alvo de estudo ao longo dos últimos anos como possível imunoterapia oncológica (140). Foram exploradas algumas vacinas de base dendrítica, como a GRNVAC1, também conhecida como AST-VAC1. Esta vacina é composta por células dendríticas autólogas, extraídas do próprio paciente, pulsadas com ARNm que codifica, entre

outras proteínas, a componente hTERT, ou seja, composta por células dendríticas imaturas induzidas a amadurecer através da sua exposição a citocinas que foram anteriormente expostas a ARNm que codifica para a componente hTERT, conferindo-lhes a capacidade de apresentar o respetivo antígeno a células efectoras do sistema imunológico, levando a uma resposta imune adaptativa do hospedeiro, conferindo assim uma ação imunoestimulante (137).

Para além das abordagens imunoterapêuticas mencionadas, estão em estudo outras que apresentam como alvo células tumorais que expressam a telomerase, como é o caso da utilização de partículas virais modificadas, ou viroterapia oncolítica, que utiliza partículas virais de adenovírus, as quais são alteradas para que a sua entrega seja específica para células com expressão positiva da telomerase, levando à infeção viral destas células, que termina na sua lise. Deste tipo de abordagem destaca-se a vacina OBP-301, ou Telomelisina, constituída por adenovírus geneticamente atenuado, mas competente para replicação, que se multiplica seletivamente em células que expressam telomerase. O mecanismo encontra-se esquematizado na figura 5.11. Este atua através da infeção viral das células tumorais, com acionamento da expressão de genes adenovirais devido à presença de uma porção do promotor hTERT, inserido no genoma viral, ativado em células que expressam a componente hTERT, determinando assim a expressão dos genes virais, denominados de E1A e E1B. A expressão seletiva de genes virais nas células que expressam a hTERT leva, por fim, à lise celular das mesmas e à indução de uma resposta imunogénica. Esta abordagem permite o tratamento destes tipos de cancro positivos para a telomerase e também auxilia na sua prevenção posterior (119,141).

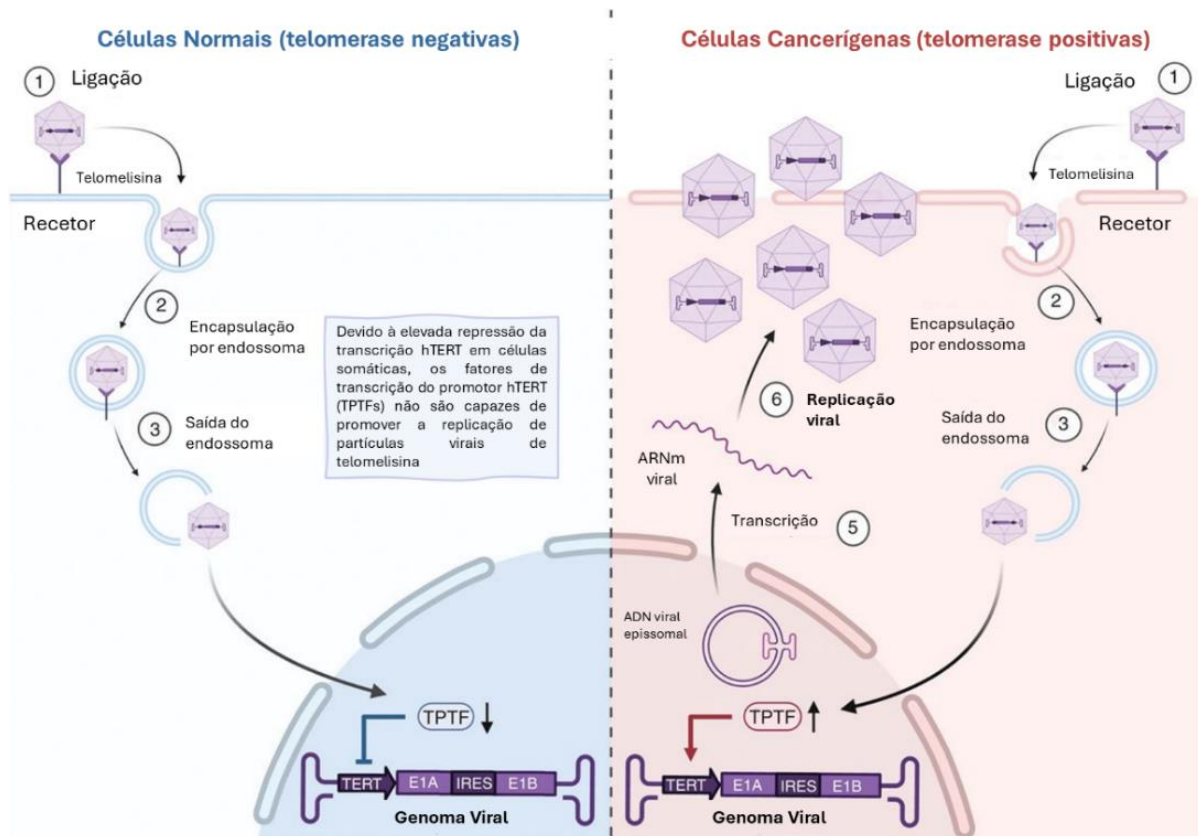


Figura 5.11 – Representação do mecanismo seletivo de ação da Telomelina em células normais versus células cancerígenas. *Adaptado de (119).*

De forma análoga, o KH901, também constituído por adenovírus oncolítico, corresponde a uma abordagem terapêutica utilizando partículas virais com capacidade replicativa específica em células positivas à expressão da telomerase e que, neste caso, expressam em simultâneo o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (142).

6. Estudos no Desenvolvimento de Inibidores da Telomerase

Desde a identificação da telomerase como possível alvo terapêutico promissor no tratamento do cancro, e subsequente validação deste alvo, tem-se explorado a utilização de inibidores da telomerase no contexto do desenvolvimento de novas estratégias anticancerígenas. Os estudos realizados têm incidido em moléculas que demonstram potencial para promover a degeneração de células cancerígenas positivas para a expressão da telomerase.

A descoberta de novos compostos naturais inibidores da telomerase, bem como o desenvolvimento de derivados ou análogos desses compostos, com características otimizadas, ou a descoberta de estruturas previamente identificadas com base em estudos *in silico*, e posteriormente selecionadas, com base em estudos *in vitro* e *in vivo*, têm permitido descartar moléculas com limitações na aplicabilidade terapêutica e também a viabilidade de outras como potenciais candidatos a futuros fármacos para este tipo de abordagem terapêutica.

Neste capítulo serão elencados os estudos a que as principais moléculas identificadas como inibidores seletivos da telomerase têm sido submetidas ao longo dos últimos anos, destacando, de entre os compostos identificados, os que apresentam maior potencial, bem como as suas possíveis aplicações em contexto clínico, e também as suas limitações e desafios associados.

6.1. Visão geral dos estudos

O desenvolvimento de fármacos inibidores da telomerase para terapia anticancerígena, à semelhança dos utilizados em terapias para outros fins, envolve várias etapas, desde a descoberta até à aprovação para utilização em contexto clínico, as quais se podem prolongar por diversos anos e requerem, em simultâneo, na maioria dos casos, a participação de diferentes entidades e de equipas multidisciplinares. Trata-se de um processo bastante complexo, que tem por objetivo assegurar a eficácia e a segurança dos potenciais fármacos, bem como a viabilidade de introdução no mercado e de distribuição, antes que sejam disponibilizados (143).

Todo o processo se inicia por ensaios pré-clínicos, que partem da identificação de compostos com potencial atividade anticancerígena. No caso particular de inibidores de telomerase é necessário identificar possíveis células alvo para quantificar a atividade inibitória dos compostos em estudo, aplicando metodologias de medição da atividade da telomerase nas células ou tecidos em questão, através de um processo característico denominado de protocolo

de amplificação de repetições teloméricas, ou *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP), desenvolvido em 1994. Este processo envolve ensaios para detetar a atividade da telomerase em amostras biológicas através da amplificação de produtos decorrentes da sua atividade, ou seja, da deteção de repetições teloméricas por meio de um processo denominado de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ou reação em cadeia da polimerase (144).

A descoberta de novas moléculas é facilitada pela utilização de estudos *in silico*, em que os ensaios são efetuados com recurso a ferramentas computacionais. Este método permite destacar, de forma expedita, os compostos mais promissores, que podem ser posteriormente submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* são conduzidos principalmente em culturas de células tumorais humanas ou animais, sendo avaliada a atividade anticancerígena e a seletividade, para a análise de potencial toxicidade, um parâmetro de elevada importância neste contexto. De referir que este tipo de compostos apresenta um potencial de toxicidade elevado, devido ao seu mecanismo de ação. A informação sobre o índice de segurança também permite obter informação acerca do intervalo de dosagens que é possível implementar. A análise dos dados obtidos permite avaliar se os compostos em questão cumprem os critérios para prosseguirem para ensaios em organismos vivos, destacando-se neste caso a utilização de camundongos transgênicos ou submetidos a xenotransplantes de tumores humanos, permitindo a máxima semelhança possível com a patologia humana (99,143).

Ao longo de todos estes processos de desenvolvimento de fármacos, é imperativo que se comprove que os mesmos podem ser usados como agentes terapêuticos, sendo essencial que satisfaçam critérios fundamentais, como uma elevada especificidade e seletividade para o alvo em questão, o que determina a sua toxicidade e segurança, estabilidade *in vivo*, eficiente internalização e retenção nas células alvo de modo a atuarem de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo igualmente importante a viabilidade da sua síntese à escala pretendida e possível estabilidade na formulação em que o fármaco é veiculado. De igual modo, devem ser avaliados parâmetros adicionais, como o perfil de biodistribuição e farmacocinética, bem como ausência de imunogenicidade indesejada, assegurando que o efeito terapêutico se mantém eficaz e seguro em condições pré-clínicas e clínicas (61).

É necessário realçar que, no contexto do desenvolvimento de fármacos desta natureza, os estudos de fase clínica, ou seja, diretamente em seres humanos, requerem especial rigor e supervisão ética, sendo necessário assegurar implementação de um protocolo detalhado relativamente a todos os aspetos que envolvem a sua administração no paciente e consequente

monitorização, tendo sempre em conta a segurança do paciente. Os estudos de fase clínica envolvem ensaios de fase I, que se centram na avaliação da tolerabilidade na dose de modo a estabelecer um intervalo seguro da mesma para o fármaco em questão, assim como a determinação de possível toxicidade associada; seguidos de ensaios de fase II, os quais permitem determinar a eficácia do composto no tratamento de uma determinada doença ou condição, e ensaios de fase III, a partir dos quais se obtém a restante informação necessária para a colocação do fármaco no mercado (145). Estes ensaios culminam na aprovação do composto para utilização na prática clínica, caso se obtenham resultados favoráveis para tal, ou seja, evidências que comprovem a sua qualidade, segurança e eficácia.

É de notar que após a sua colocação no mercado, estes fármacos continuam sujeitos a monitorização pós-comercialização, denominada de ensaios de fase IV, que permitem obter dados de monitorização a longo prazo decorrentes da sua utilização na prática clínica. A farmacovigilância é fundamental neste processo.

6.2. Principais fármacos em estudo

Dos estudos realizados em compostos identificados como inibidores da telomerase resultou evidência científica que permitiu destacar apenas alguns, para os quais se têm obtido resultados significativos e promissores para uma possível utilização futura na terapêutica anticancerígena. Na tabela 6.1 encontram-se, de forma resumida, os principais estudos pré-clínicos e clínicos concluídos até ao momento, envolvendo os fármacos inibidores da telomerase atualmente em estudo, e na tabela 6.2 são resumidos os estudos clínicos a decorrer envolvendo estes mesmos fármacos. Nas tabelas são indicadas as fontes bibliográficas para cada caso, e referências de identificação dos estudos clínicos em curso. Estes estudos serão abordados em maior pormenor.

Tabela 6.1 –Visão geral dos ensaios pré-clínicos e clínicos no desenvolvimento dos inibidores da telomerase mais promissores.

Inibidor da Telomerase	Tipo(s) de Tumor(es)	Tipo de Estudo	Referência (s)
Imetelstat	Cancro do pulmão	Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Dikmen ZG <i>et al.</i> , 2005 (146) Jackson ZG <i>et al.</i> , 2007 (147)
	Cancro da mama	Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Geller GC <i>et al.</i> , 2006 (148) Hochreiter AE <i>et al.</i> , 2006 (149) Gomez-Millan J <i>et al.</i> , 2007 (150)
	Cancro da bexiga	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Dikmen ZG <i>et al.</i> , 2008 (151)
	Glioblastoma	Pré-clínico (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Marian CO <i>et al.</i> , 2010 (152)
	Tumores sólidos refratários ou recorrentes em crianças	Clínico (Fase I)	Thompson PA <i>et al.</i> , 2013 (153)
	Cancro pancreático	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Burchett KM <i>et al.</i> , 2014 (154)
	Cancro da mama HER2+	Pré-clínico (<i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>)	Koziel JE <i>et al.</i> , 2015 (155)
	Trombocitemia essencial	Clínico (fase II)	Baerlocher GM <i>et al.</i> , 2015 (156)
	Mielofibrose	Clínico (fase II)	Tefferi A <i>et al.</i> , 2015 (157)
	Tumores cerebrais recorrentes ou refratários em crianças	Clínico (Fase II)	Salloum R <i>et al.</i> , 2016 (158)
	Cancro do pulmão de células não pequenas	Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Frink RE <i>et al.</i> , 2016 (159)
	Mielofibrose recidivante ou refratária	Clínico (Fase II)	Mascarenhas J <i>et al.</i> , 2021 (160)
	Síndrome Mielodisplásica de baixo risco recidivante ou refratária a agentes estimuladores da eritropoiese	Clínico (fase III)	Platzbecker U <i>et al.</i> , 2024 (161)
	THIO	_____	Pré-clínico (<i>in vivo</i>)
Cancro do cólon; Cancro do pulmão de células não pequenas		Pré-clínico (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Mender I <i>et al.</i> , 2015 (163)
Tumor cerebral pediátrico resistente à terapia clássica		Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Sengupta S <i>et al.</i> , 2018 (164)
Cancro do pulmão de células não pequenas		Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Mender I <i>et al.</i> , 2018 (165)
_____		Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Mender I <i>et al.</i> , 2020 (166)
Cancro do pulmão; Cancro do cólon; Carcinoma hepatocelular		Pré-clínico (<i>in vitro</i> e <i>n vivo</i>)	Mender I <i>et al.</i> , 2025 (167)

MST-312	Cancro da mama	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Gurung RL <i>et al.</i> , 2014 (168) Morais KDS <i>et al.</i> , 2019 (169) Sameni S <i>et al.</i> , 2023 (170)
	Mieloma múltiplo	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Ameri Z <i>et al.</i> , 2019 (171)
	_____	Clínico (fase II)	Zhou C <i>et al.</i> , 2022 (172)
	Cancro do ovário	Pré-clínico (<i>in vivo</i>)	Fernandes SG <i>et al.</i> , 2023 (114)
BIBR-1532	Cancro do pulmão de células não pequenas	Pré-clínico (<i>in vitro</i>) Pré-clínico (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Ding X <i>et al.</i> , 2019 (173) Bao Y <i>et al.</i> , 2024 (174)
	Carcinoma espinocelular	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Altamura G <i>et al.</i> , 2021 (116)
	Leucemia mieloide aguda	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Rafat A <i>et al.</i> , 2022 (175) Rafat A <i>et al.</i> , 2025 (176)
	Mieloma múltiplo	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Zhang Y <i>et al.</i> , 2023 (177)
	Cancro da mama	Pré-clínico (<i>in vitro</i>)	Mazloumi Z <i>et al.</i> , 2023 (178)
	Carcinoma de células escamosas do esófago	Pré-clínico (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Wang Q <i>et al.</i> , 2025 (179)

Tabela 6.2 –Visão geral dos ensaios clínicos atualmente a decorrer envolvendo os inibidores da telomerase mais promissores.

Inibidor da Telomerase	Tipo(s) de Tumor(es)	Título Oficial	Tipo de Estudo	Identificação (ões) do estudo
Imetelstat	Leucemia mieloide aguda recidivante ou refratária; Síndromes mielodisplásicas de alto risco	<i>A Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Imetelstat in Patients with HR Myelodysplastic Syndromes or AML Failing HMA-based Therapy</i>	Clínico (fase II)	IMpress_001; NCT05583552
	Mielofibrose	<i>An Open Label, Phase I/1b Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Activity of Imetelstat in Combination With Ruxolitinib in Patients With Myelofibrosis</i>	Clínico (fase I,Ib)	IMproveMF; MYF100; NCT05371964
	Mielofibrose recidivante ou refratária, de risco intermédio ou elevado	<i>A Randomized Open-Label, Phase 3 Study to Evaluate Imetelstat (GRN163L) Versus Best Available Therapy (BAT) in Patients With Intermediate-2 or High-risk Myelofibrosis (MF) Relapsed / Refractory (R/R) to Janus Kinase (JAK) Inhibitor</i>	Clínico (fase III)	IMpactMF; MYF3001; 2023-509120-17-00 (CTIS); 2020-003288-24 (EudraCT); NCT04576156
	Leucemia mieloide aguda recidivante ou refratária; Síndrome mielodisplásica ou Leucemia mielomonocítica juvenil	<i>A Phase I Study of GRN163L (Imetelstat) in Combination With Fludarabine and Cytarabine for Patients With Acute Myeloid Leukemia That is in Second or Greater Relapse or That is Refractory to Relapse Therapy; Myelodysplastic Syndrome or Juvenile Myelomonocytic Leukemia in First or Greater Relapse or is Refractory to Relapse Therapy</i>	Clínico (fase I)	PEPN2312; NCI-2023-11026; UM1CA228823 (NIH); NCT06247787
	Síndrome mielodisplásica de risco baixo ou intermédio	<i>A Study to Evaluate Imetelstat (GRN163L) in Transfusion-Dependent Subjects With IPSS Low or Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) That is Relapsed/Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agent (ESA) Treatment</i>	Clínico (fase II e III)	CR107947; 63935937MDS3001; 2024-511348-25-00 (CTIS) 2015-002874-19 (EudraCT); NCT02598661

	Cancro do pulmão de células não pequenas	<i>A Multicenter, Open-Label, Dose-Finding, Phase 2 Study Evaluating THIO Sequenced With Cemiplimab (LIBTAYO®) in Subjects With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)</i>	Clínico (Fase II)	THIO-101; 2023-504595-26-00 (CTIS); 2021-005136-34 (EudraCT); NCT05208944
THIO	Cancro do pulmão de células não pequenas	<i>A Multicenter, Open-label, Randomized Phase 3 Study of THIO Sequenced With Cemiplimab (LIBTAYO®) vs Investigator's Choice of Chemotherapy as Third-line Treatment in Advanced/Metastatic NSCLC</i>	Clínico (Fase III)	THIO-104; 2024-520164-33-00 (CTIS); NCT06908304

6.2.1. Imetelstat

O composto GRN163L, ou Imetelstat, é um inibidor oligonucleotídico direto e competitivo da telomerase cujo mecanismo de ação foi abordado no ponto 5.2.2.1. Este foi o primeiro agente inibidor da telomerase a entrar em ensaios clínicos, desenvolvido pela *Geron Corporation*, uma empresa de biotecnologia fundada em 1990. Os estudos visando o desenvolvimento de oligonucleótidos com atividade de inibição competitiva do *template* de ARN da telomerase iniciaram-se em 2003 e em 2005 foi criado este fármaco, após várias tentativas de alteração estrutural de modo a aumentar a sua potência como inibidor da telomerase. A etapa final de otimização envolveu a adição de um grupo palmitoilo ao composto precursor, GRN163 (180).

Após design e otimização, o composto GRN163L foi submetido a diversos ensaios pré-clínicos, os quais permitiram uma boa caracterização das suas propriedades, tendo como foco o seu possível potencial terapêutico em diversos tipos de cancro, incluindo cancro do pulmão (146,147,181), da mama (148–150,181), da bexiga (151,181), e no glioblastoma (152). Nos estudos foram utilizadas predominantemente culturas celulares de células tumorais humanas e modelos de xenotransplante em camundongos. Em geral, estes estudos pré-clínicos evidenciaram bons resultados ao nível do controlo na progressão do tumor (181).

Mais tarde destacou-se um estudo em células pancreáticas tumorais humanas, publicado em 2014, no qual foram obtidos resultados positivos relativamente ao efeito reversor do fenótipo imortal destas células, no entanto estes resultados não foram confirmados num tratamento a longo prazo (154). Outro estudo, publicado em 2015, avaliou este composto em células

estaminais cancerígenas e células de cancro da mama positivas para o recetor HER2. Os resultados permitiram concluir que o uso isolado do composto GRN163L, em ambos os tipos de células, inibiu a sua proliferação. Foi estudado em simultâneo o seu potencial quando usado em combinação com o trastuzumab, um fármaco utilizado no tratamento do cancro da mama HER2+ metastizado (155). Este estudo envolveu a realização de um ensaio clínico de fase I, iniciado em 2011 e terminado em 2015, cujos resultados não foram publicados até ao presente momento (182).

Em 2013, o composto GRN163L foi submetido a ensaios de fase I para o tratamento de tumores sólidos refratários ou recorrentes em crianças, demonstrando as potencialidades do seu uso neste contexto. Foi confirmada a tolerabilidade do composto e determinada a dose ótima recomendável (153). Posteriormente seguiu para um estudo de fase II (158), com resultados publicados em 2017, que se focou na sua utilidade para tratamento de tumores sólidos refratários do sistema nervoso central em crianças, incluindo meduloblastoma, glioma de alto grau, ependimoma e glioma pontino difuso intrínseco. Todavia, a utilização do GRN163L em contexto clínico de tumores sólidos não se mostrou tão promissora quanto a evidenciada ao nível das doenças malignas mieloides, o que foi atribuído à elevada toxicidade revelada nas crianças que apresentam este tipo de tumores recorrentes. Em consequência, os ensaios com GRN163L passaram a centrar-se mais nesse tipo de patologias hematológicas (158,183).

O Imetelstat (GRN163L) tem mostrado maior potencialidade de utilização no tratamento de condições associadas a patologias hematológicas malignas que afetam a linhagem mieloide, caracterizadas pela produção de células sanguíneas anormais dessa linhagem, resultando numa contagem insuficiente deste tipo de células saudáveis no sangue. Estas patologias englobam 4 tipos clássicos de neoplasias mieloproliferativas ou síndromes mielodisplásicas (SMDs) que incluem a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primária (MFP), a policitemia vera (PV) e a leucemia mieloide crónica (LMC) (94).

O Imetelstat foi submetido em 2015 a dois ensaios de fase II. Um deles envolveu pacientes com TE (156) enquanto o outro envolveu pacientes com Mielofibrose (157). Nestes observaram-se respostas hematológicas e moleculares rápidas e duráveis, pela redução do crescimento e divisão, associada à morte deste tipo de células anormais, em pacientes com TE assim como em pacientes com mielofibrose, evidenciando o potencial do fármaco. No entanto foi constatado em simultâneo um elevado potencial mielossupressor, principalmente evidenciado por trombocitopenia e neutropenia (156,157).

A modulação da dosagem e frequência de administração do Imetelstat permitiu a sua aprovação para entrada em ensaios de fase III, iniciados em 2019 e com resultados publicados em 2024. Os ensaios envolveram a utilização de Imetelstat no tratamento de SMDs de baixo risco, em pacientes com anemia dependentes de transfusão e não elegíveis, que não respondem, ou que sofreram relapso após a utilização de agentes estimuladores da eritropoiese. Este estudo, denominado *Imerge*, gerou evidências bastante positivas que permitiram comprovar a potencialidade do Imetelstat para o tratamento de pacientes com este tipo de patologia, demonstrando, através dos resultados obtidos, a capacidade do fármaco para proporcionar independência de transfusões por um período longo, de aproximadamente 1 ano, e comprovando também uma atividade modificadora da doença (161).

Em consequência, no mesmo ano de 2024, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), agência responsável, entre outras funções, pela aprovação e supervisão de medicamentos nos Estados Unidos da América, procedeu à aprovação do Imetelstat, com o nome comercial Rytelo®, para o tratamento de anemias dependentes de transfusão, que requerem quatro ou mais unidades de hemácias num intervalo de oito semanas, em pacientes com SMDs de risco baixo a intermédio, e que não apresentam a deleção 5q isolada (184). Posteriormente, em 2025, este medicamento, designado como medicamento órfão devido à utilização neste tipo de doenças raras, foi aprovado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) para utilização nos países da União Europeia, com essa mesma indicação terapêutica (185).

O Imetelstat (Rytelo®) é, até ao momento, o único fármaco aprovado para uso clínico que tem como principal atividade a inibição da telomerase.

O Imetelstat continua a ser alvo de estudos, encontrando-se em ensaios de fase III para o tratamento de mielofibrose recidivante ou refratária aos fármacos inibidores da JAK (186), (estudo *IMPactME*) e em ensaios de fase II (estudo *IMpress*) que avaliam a sua utilização em pacientes com leucemia mieloide aguda, recidivantes, refratários ou intolerantes a agentes hipometilantes, ou SMDs de alto risco (187).

Estão a ser desenvolvidos outros ensaios em estágio mais inicial, os quais exploram o potencial terapêutico do Imetelstat em indicações adicionais, como agente único e também em combinação com outras terapias padrão já implementadas. Nomeadamente, o estudo de fase I *IMproveME* pretende avaliar a utilização do Imetelstat em associação com o fármaco ruxolitinibe em pacientes com mielofibrose (188), sendo esperado que esta abordagem permita

obter resultados favoráveis no prognóstico desta doença, numa fase mais precoce. Este ensaio, dividido em duas partes, tem demonstrado resultados promissores, que foram apresentados e discutidos na conferência anual da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) no ano de 2025 (189). Outro estudo clínico de fase I, do início de 2025, que se encontra em curso, apresenta como objetivo principal a avaliação da utilização do Imetelstat em associação com a fludarabina e a citarabina, ambos inibidores da síntese de ADN, em pacientes com leucemia mieloide aguda e também em pacientes com síndrome mielodisplásica ou leucemia mielomonocítica juvenil, todas estas de carácter recidivante ou refratário (190).

6.2.2. THIO

O THIO, Ateganosina, 6-tio-dG ou ainda 6-tio-2'-desoxiguanosina, é um composto de estudos pré-clínicos (*in vitro*), englobando diversos tumores que apresentam expressão ativa da telomerase (191).

Esta molécula, desenvolvida a partir da 6-tioguanina, modificada pela inserção de um grupo desoxiguanosina na posição 2, foi apresentada pela primeira vez em 2014, decorrente de um estudo pré-clínico com o objetivo de determinar os seus efeitos e toxicidade em células tumorais e em células normais, *in vitro* e *in vivo*. O estudo revelou resultados positivos na indução da senescência seletiva de células de linhagens cancerígenas, tendo sido assim demonstrado o potencial do composto (162,192).

O THIO foi posteriormente submetido a um estudo *in vivo* para avaliação da sua atividade como possível agente terapêutico no tratamento de tumores cerebrais positivos para a expressão da telomerase, em crianças resistentes a outras terapias, já que este composto tem capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Os resultados obtidos, publicados em 2017, demonstram o potencial do composto para tratar este tipo de tumores, tanto como agente único como em combinação com fármacos que atuam pela inibição da fase de verificação G2 do ciclo celular (164). Outro ensaio *in vivo* deste composto, efetuado em simultâneo, avaliou a sua potencialidade na terapêutica de cancro de células não pequenas do pulmão. O estudo conduziu a resultados favoráveis para a sua utilização neste contexto, indicando que o THIO poderá prolongar o controlo da doença em casos de resistência às terapias tradicionais, tendo sido também demonstrada uma baixa toxicidade associada (165).

Em 2020 foram publicados resultados de um estudo *in vivo*, que avaliou a utilização de THIO numa abordagem terapêutica conjunta com imunoterapia, em combinação com fármacos anti-PD-L1. O estudo, realizado em modelos animais, demonstrou que este tipo de abordagem tem potencial para eliminar completamente tumores avançados, explicado pela capacidade do composto de aumentar o stress celular, originando conseqüentemente uma melhoria na capacidade imunitária adaptativa antitumoral do indivíduo, que se pode manter por períodos longos. Assim, a combinação de THIO com imunoterapia surge como muito promissora (166).

Atualmente, o composto THIO encontra-se em estudos clínicos de fase II (193), que têm evidenciado bons resultados, e, mais recentemente de fase III, para o tratamento de cancro de células não pequenas do pulmão em estado avançado ou metastático, em associação com o cemiplimab, de nome comercial Libtayo®, um anticorpo monoclonal que bloqueia a via PD-1/PD-L1. Este estudo tem como principal objetivo testar a hipótese de que doses baixas de THIO (Ateganosina), administradas previamente ao tratamento com Libtayo®, permitem intensificar e prolongar a resposta imunitária antitumoral à terapêutica de primeira linha, em pacientes com este tipo de cancro refratário (191,194).

6.2.3. MST-312

Ao contrário dos compostos referidos anteriormente, desenvolvidos por empresas farmacêuticas, o MST-312 foi originalmente desenvolvido em contexto académico. É um composto sintético derivado do composto natural 3-galato-epigallocatequina (EGCG), o principal polifenol encontrado no chá verde (*Camellia sinensis*). Em estudos pré-clínicos, a EGCG evidenciou diversos efeitos a nível celular, nomeadamente preventivos no desenvolvimento de malignidades, que foram relatados pela primeira vez em 2006 (195). De entre as atividades evidenciadas por este composto, foi reportada a capacidade de inibição da telomerase, promovendo a senescência celular, o que foi atribuído a um radical galoílo, muito reativo e com capacidade de modificar covalentemente a telomerase, inibindo a sua atividade, formado por metabolização do composto natural (195). Apesar dos resultados favoráveis exibidos pela EGCG neste contexto, este composto apresenta baixa biodisponibilidade oral, baixa absorção a nível intestinal e tempo de semivida plasmático curto. Acresce a sua propensão para causar toxicidade hepática, em doses mais elevadas, assim como a sua interação na

metabolização de outros fármacos. Estas fragilidades tornam o EGCG um candidato precário a fármaco anticancerígeno, tendo sido envidados esforços no sentido de as ultrapassar (196).

O MST-312 foi desenvolvido em resultado da estratégia de otimização da EGCG, para utilização na terapêutica anticancerígena. O desenvolvimento tem-se centrado maioritariamente em ensaios pré-clínicos, para a maioria dos tumores estudados nesse contexto até ao momento, de que se destacam o cancro da mama, o cancro do ovário e o mieloma múltiplo. Contudo, é de destacar que o composto MST-312 já foi envolvido em ensaios clínicos de fase II para o tratamento do mieloma múltiplo, em pacientes previamente submetidos a transplante autólogo de células estaminais. Neste estudo o MST-312 evidenciou capacidade de inibição do progresso da doença, atuando de forma seletiva no crescimento tumoral do mieloma. Estes resultados colocam o composto MST-312 como um potencial candidato para o tratamento deste tipo de cancro (172).

6.2.4. BIBR-1532

O composto BIBR-1532 destaca-se pela sua capacidade de inibição direta da componente hTERT da telomerase, demonstrando características fármacofóricas promissoras. Este composto tem sido submetido a diversos estudos ao longo dos anos, revelando fragilidades ao nível das propriedades farmacocinéticas, o que tem restringido o seu potencial para utilização em terapêutica anticancerígena, destacando-se a biodisponibilidade limitada e indução de citotoxicidade, quando administrado em doses mais altas (81). Estas limitações estimularam a pesquisa de novos derivados deste composto, o que poderá culminar na identificação de novas moléculas, com esta atividade farmacológica que possam ter utilização clínica (117,118).

Não obstante o exposto, o composto BIBR-1532 continua a ser alvo de diversos estudos de carácter pré-clínico centrados na avaliação da sua eficácia contra diversos tipos de cancro, como agente isolado ou em combinação com outros fármacos. Os estudos têm sido conduzidos utilizando modelos celulares que tornam possível uma aproximação da possível atividade do composto em várias neoplasias, como o cancro de células não pequenas do pulmão (173), o carcinoma espinocelular (116), a leucemia mieloide aguda (175,176,197), o mieloma múltiplo (177), o cancro da mama (178) e também o carcinoma de células escamosas do esófago (179). Os resultados dos estudos apontam para a possível utilização do BIBR-1532 em associação com

outros agentes anticancerígenos, como é o caso de imunoterapias com utilização de células *natural killer* (NK), de modo a melhorar a capacidade imunitária do indivíduo na eliminação de células cancerígenas. Esta abordagem está a ser estudada para o cancro da mama (178) e para a leucemia mieloide aguda (176,197).

6.3. Desafios e limitações terapêuticas dos inibidores de telomerasas

A telomerase apresenta muitas características que a destacam como alvo ideal para terapêutica anticancerígena. No entanto, o desenvolvimento de terapias bem-sucedidas tem sido algo muito difícil devido a diversos desafios encontrados ao longo de todas as etapas envolvidas no desenvolvimento deste tipo de terapias, destacando-se limitações nos modelos pré-clínicos, falta de conhecimento aprofundado sobre aspetos que englobam a estrutura e as funções da telomerase e ainda os processos de resistência adaptativa, ou seja, os mecanismos celulares de adaptação à atividade dos compostos estudados (99).

Um dos principais obstáculos é a capacidade limitada de simular em laboratório, utilizando modelos *in vivo*, a patologia humana, muitas vezes recorrendo à utilização de modelos de camundongos. Este aspeto é particularmente relevante neste tipo de estudos já que as estruturas do telómero e da telomerase apresentam diferenças significativas entre espécies, principalmente entre espécies tão distantes em termos de semelhanças patológicas como o humano e o camundongo, mesmo recorrendo a alterações genéticas de modo a conseguir maior semelhança (99). Os camundongos apresentam telómeros mais longos que os do ser humano, e as suas células não aparentam ser dependentes da erosão do telómero como mecanismo de senescência celular, para além de que a telomerase nestes animais é expressa em maior amplitude, mesmo em tecidos adultos, o que indica que em camundongos a telomerase não se apresenta como bom marcador tumoral, ao contrário do que se verifica em seres humanos (99,198,199). Acresce que alterações no funcionamento da telomerase ou na estrutura dos telómeros em células homólogas de camundongo e humanas conduzem a fenótipos diferentes (99,200). Todas estas diferenças criam dificuldades na avaliação de resultados pré-clínicos de estudos centrados na avaliação de potenciais entidades farmacológicas direcionadas à telomerase. Têm sido desenvolvidas algumas estratégias para amplificar a capacidade de extrapolar este tipo de resultados, como é o caso da utilização de xenotransplantes, em que o animal sofre transplante de tecidos de tumor

de um paciente, permitindo a utilização de um modelo *in vivo* com características mais próximas do que ocorre no organismo humano e viável em contexto pré-clínico (99).

Outra limitação resulta de um conhecimento ainda restrito da estrutura, composição e atividade da telomerase. Sendo esta o alvo validado para terapêuticas baseadas na sua inibição, é essencial reforçar o conhecimento relativamente a todos os aspetos que a envolvem, sendo ideal que este conhecimento seja específico da telomerase humana, o que permanece pouco desenvolvido. Esta limitação decorre principalmente de dificuldades na purificação e cristalização da polimerase humana, já que a abundância desta enzima a nível intracelular é muito baixa, o que limita a exequibilidade dos estudos acerca da sua estrutura e funções e também cria dificuldades na sua purificação para triagem em larga escala de novos compostos (201). As primeiras construções de modelos desta holoenzima foram dos domínios TERT, da espécie de protozoário *Tetrahymena thermophila* (202) e de uma espécie de besouro castanho, *Tribolium castaneum* (203), obtidas por microscopia eletrónica de alta resolução. Estes modelos permitem apenas examinar superficialmente, neste contexto, algumas características que se possam assemelhar ao que se verificaria na telomerase humana. Hoje em dia, já existem estudos de análise da telomerase humana obtidos por microscopia de alta resolução crioelétrica, o que tem permitido um conhecimento mais aprofundado das componentes hTERT e hTR e da sua estrutura completa, decorrente da junção das mesmas, assim como do seu sítio ativo (204). No entanto, não só a sua estrutura como todas as suas funções a nível celular conferem características que continuam a carecer de aprofundamento, sendo este conhecimento imprescindível para aperfeiçoar o design de novos inibidores mais eficazes, ou otimizar as características de moléculas já identificadas (99).

Outro aspeto com impacto negativo no potencial dos inibidores que podem vir a ser utilizados na prática clínica é a elevada capacidade de desenvolvimento de resistências por parte das células alvo tumorais. A maioria das células tumorais depende da atividade da telomerase como principal mecanismo de manutenção do comprimento dos telómeros. No entanto, as células não apresentam apenas esse mecanismo possível de extensão telomérica, existindo outros, como o ALT, abordado no subcapítulo 4.1. Este mecanismo opera especialmente em células de tumores de tecido mesenquimal, ou sarcomas (205), nos quais a perda da região terminal dos telómeros é remodelada por um mecanismo de recombinação telomérica (99).

A existência de mecanismos de extensão dos telómeros independentes da atividade da telomerase mostra que a utilização de compostos inibidores desta enzima pode levar a que as

células se adaptem facilmente à redução ou ausência da sua atividade. Esta possibilidade já foi alvo de estudo em células tumorais humanas, tendo sido verificada a ocorrência muito rara desse mecanismo ALT após a inibição da telomerase (206). Contudo não se pode eliminar a possibilidade de desenvolvimento de resistências, principalmente numa exposição a longo prazo a inibidores de telomerase, dada a existência conhecida de outras alternativas celulares ao funcionamento desta enzima (99).

Outro aspeto de elevada importância associado aos inibidores da telomerase é a sua capacidade de causar elevada toxicidade. Apesar de a maioria das células somáticas normais humanas apresentarem ausência de atividade da telomerase, devido ao silenciamento da expressão da componente hTERT, células com elevada taxa proliferativa, como as células estaminais de linhagem germinativa, apresentam esta enzima ativa. Deste modo, é previsível que os inibidores de telomerase atuem nas células alvo tumorais, mas possam atuar também nesse tipo de células, causando efeitos indesejáveis de elevada toxicidade, com impacto principalmente nos tecidos da medula óssea, mucosa intestinal e folículos capilares, com elevada capacidade para gerar efeitos adversos hematológicos e gastrointestinais, destacando-se a mielossupressão, que se traduz essencialmente em trombocitopenia e neutropenia, sintomas que se evidenciam num tratamento prolongado utilizando este tipo de compostos e que têm sido a principal razão pela qual muitos dos compostos desenvolvidos continuam restritos a estudos pré-clínicos (99,207).

É de notar também que em células tumorais são apenas necessárias algumas moléculas da componente hTERT para superar a ativação de mecanismos de senescência nas células. Por conseguinte, a potência dos compostos na inibição desta enzima tem de ser muito elevada e, também é necessário que, após o início de ação, ainda ocorram algumas divisões celulares para que o efeito indutor de senescência se comece a verificar, já que é necessária a erosão contínua das regiões teloméricas para que sejam desencadeados mecanismos de resposta celulares, sem esquecer que até ao início da atividade do inibidor os telómeros apresentam comprimento adequado decorrente da atividade da telomerase (99,207). Há assim um tempo de latência entre o início da administração dos compostos e a diminuição da carga tumoral que pode demorar semanas a meses, o que comporta uma desvantagem significativa na eficácia da sua ação e na sua aplicação clínica (208).

Para além dos desafios elencados, é necessário considerar que muita da investigação em curso envolvendo a telomerase tem por base o seu papel no envelhecimento, e doenças associadas. O possível papel da enzima na regeneração celular compete com este tipo de estudos, que encaram

a imortalidade celular como alvo anticancerígeno. Contudo, o objetivo do desenvolvimento de inibidores de telomerase é incomparavelmente mais significativo, com foco em salvar milhões de pessoas com cancro, em todo o mundo (209).

6.4. Perspetivas futuras

Atualmente, a telomerase encontra-se validada como um alvo terapêutico no desenvolvimento de terapêuticas anticancerígenas, pelo que se tem assistido ao longo dos últimos tempos a uma vasta investigação sobre a sua estrutura e função e também direcionada para o desenvolvimento de fármacos que interfiram com este alvo perspetivando o seu uso potencial em diversos tipos de cancros que demonstram uma elevada expressão desta enzima. Embora vários compostos tenham sido identificados como inibidores da telomerase, apenas alguns mostraram potencial em estudos pré-clínicos e muito poucos prosseguiram para ensaios clínicos (99).

A aprovação do Imetelstat pela *Food and Drug Administration*, e mais tarde pela Agência Europeia do Medicamento, para utilização em SMDs de risco baixo a intermédio, reforçou a aposta na viabilidade terapêutica de inibidores da telomerase, abrindo caminho para investigações clínicas mais aprofundadas de compostos com potencial. Estes estudos envolveram principalmente os compostos THIO, MST-312 e BIBR-1532. Contudo, muito há ainda a fazer no caminho de desenvolvimento destes compostos. É necessário também rever a utilização deste tipo de moléculas, encarando-as não só como compostos de ação primária, mas essencialmente como agentes sensibilizadores de células cancerígenas, dirigindo a ação dos compostos para o enfraquecimento da sua capacidade de migração e propriedades de adesão, por forma a limitar o seu potencial agressivo. Esta abordagem tem potencial para fornecer novas terapias combinadas, de maior eficácia no tratamento de certos tipos de cancro, baseadas numa atividade sinérgica antitumoral. Exemplos são a possível utilização do Imetelstat em associação com um inibidor da cinase *Janus* (JAK), nomeadamente o ruxolitinib, no tratamento de mielofibrose (188), ou em associação com a fludarabina e citarabina no tratamento da leucemia mieloide aguda, da síndrome mielodisplásica ou da leucemia mielomonocítica juvenil, refratárias ou recorrentes (190). O composto THIO também tem sido alvo de estudos para utilização em combinação com outros fármacos, mais concretamente com o cemiplimab. O composto BIBR-1532 mostrou resultados positivos, em combinação com

radioterapia, no tratamento do cancro de células não pequenas do pulmão (174), e também em associação com imunoterapias que envolvem o uso de células *natural killer* (176,178,197)

Os estudos referidos mostram que a aplicação de inibidores da telomerase no tratamento do cancro poderá ser muito promissora no contexto de terapias de associação, aportando novas ferramentas para ultrapassar barreiras atualmente existentes, como o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos fármacos tradicionais, e também de modo a preencher lacunas existentes no tratamento de tumores em estágios mais avançados.

Outro campo de investigação bastante promissor é o da imunoterapia antitelomerase, que envolve uma abordagem diferente da inibição desta enzima, mas que poderá ter muito impacto na terapêutica anticancerígena. Este tipo de abordagem terapêutica tem conduzido a resultados muito promissores, estando em curso diversos estudos clínicos avançados envolvendo tanto vacinas antitelomerase como procedimentos que envolvem a utilização de células dendríticas modificadas, e também o uso de vírus oncolíticos, que apresentam como alvo células tumorais que expressam a telomerase (134,141).

A investigação aprofundada das diferentes funções da telomerase, ou das diferentes componentes que a constituem, poderá também fornecer novas pistas para utilizações possíveis deste tipo de fármacos, ampliando as possibilidades futuras da sua utilização (210).

7. Conclusões

O cancro caracteriza-se como um dos maiores problemas de saúde do século XXI, sendo responsável por quase uma em cada seis mortes a nível mundial. O impacto causado pelas patologias cancerígenas é imenso, o que torna imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas capazes de controlar a morbilidade e reduzir a mortalidade associada.

Tendo com vista a melhoria de tratamentos atualmente existentes assim como o desenvolvimento de novos tratamentos, mais eficazes, têm sido explorados novos alvos promissores para terapias inovadoras. Destaca-se neste contexto a enzima telomerase, presente em cerca de 90% dos tipos de cancro e ausente na maioria nas células normais somáticas, o que pode conferir uma expressão altamente seletiva em células malignas.

Ao longo da última década o conhecimento existente acerca da enzima telomerase tem sofrido avanços notáveis, possibilitando uma caracterização cada vez mais detalhada, não só da sua estrutura como um todo, mas também das componentes que a constituem, associada a um progresso simultâneo na compreensão dos principais mecanismos que envolvem a sua atividade a nível celular. Embora as primeiras descobertas tenham sido realizadas em modelos de espécies de protozoários e de insetos, atualmente já existe um entendimento consistente específico da telomerase humana e da sua atividade principal ao nível dos telómeros, embora continue a ser necessário um maior conhecimento acerca das suas funções extra-teloméricas, as quais podem evidenciar futuramente um maior leque de utilizações deste tipo de compostos.

O progresso significativo que se observa na exploração da telomerase como alvo promissor na terapêutica anticancerígena tem permitido o desenvolvimento de novos compostos com propriedades progressivamente otimizadas, principalmente derivados de fármacos já identificados e para os quais já se encontram bem estabelecidas as suas propriedades. Contudo, observa-se que os mesmos ainda se encontram em fases pré-clínicas muito iniciais, sendo necessário que sejam objeto de muitos mais estudos que confirmem a sua eficácia, segurança e dose adequada, para que futuramente possam vir a ser considerados na prática clínica.

Atualmente, apenas um composto inibidor específico da telomerase se encontra aprovado para uso clínico, o Imetelstat, medicamento com o nome comercial Rytelo®. Este composto continua a ser alvo de investigação contínua para ampliar as suas indicações terapêuticas. Outros compostos, como o THIO, MST-312 e BIBR-1532 demonstraram potencial promissor.

Apesar de todos os desafios no desenvolvimento deste tipo de compostos, a investigação nesta área continua a abrir novas possibilidades, incluindo na descoberta de novos compostos com propriedades melhoradas e na aplicação de estratégias terapêuticas de combinação com terapias convencionais, como quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia. Os inibidores da telomerase revelam-se assim como candidatos promissores, com potencial para integrar futuras estratégias terapêuticas anticancerígenas, sinalizando um novo caminho no tratamento do cancro.

5. Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization [citado a 21 de junho de 2024]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
2. Serviço Nacional de Saúde (Portugal). Cancro [Internet]. SNS24; 11 maio 2023 [citado a 12 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/>
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–63.
4. National Cancer Institute (U.S.). Cancer Classification [internet]. SEER Training Modules. [citado a 21 de junho de 2024]. Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
5. Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2ª edição. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000:719-728. ISBN: 9780878931064
6. World Health Organization (Regional Office for Europe). Cancer [Internet]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; [citado a 21 de junho de 2024]. Disponível em: https://www.who.int/europe/health-topics/cancer#tab=tab_1
7. OECD. Perfil sobre cancro por país: Portugal 2023. Paris: OECD Publishing; 2023 [Internet]. 1 de fevereiro de 2023 [citado a 22 de junho de 2024]. Disponível em: https://www.oecd.org/pt/publications/perfil-sobre-cancro-por-pais-portugal-2023_40186a6b-pt.html
8. Serviço Nacional de Saúde (Portugal). Fatores de risco para o cancro [Internet]. SNS24; 3 de abril de 2025 [citado a 22 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/fatores-de-risco-para-o-cancro/>
9. Power C, Kuh D, Morton S. From developmental origins of adult disease to life course research on adult disease and aging: Insights from birth cohort studies. *Annu Rev Public Health* [Internet]. 2013;34:7–28. [citado a 25 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-publhealth-031912-114423>
10. Liga Portuguesa Contra o Cancro [Internet]. Lisboa: Liga Portuguesa Contra o Cancro; [citado a 22 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.ligacontracancro.pt/>
11. Cancro - Comissão Europeia [Internet]. Bruxelas: Comissão Europeia; [citado a 27 de junho de 2025]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer_pt
12. Kumar L, Kumar S, Sandeep K, Patel SKS. Therapeutic Approaches in Pancreatic Cancer: Recent Updates. *Biomedicines* 2023, Vol 11, Page 1611 [Internet]. 2023;11(6):1611. [citado a 27 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/6/1611/htm>
13. Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1 [Internet]. 2024;9(1):1–36. [citado a 27 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-024-01848-7>
14. Stewart BW. Mechanisms of carcinogenesis: from initiation and promotion to the hallmarks. *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis* [Internet]. 2019 [citado 29 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570326/>

15. Yu X, Zhao H, Wang R, Chen Y, Ouyang X, Li W, et al. Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discovery* 2024 10:1 [Internet]. 2024;10(1):1–12. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41420-024-01803-z>
16. Botelho MC, Teixeira JP, Oliveira PA. Carcinogenesis. Wexler P. *Encyclopedia of Toxicology: 3ª edição*. San Diego: Academic Press; 2014;713–29. ISBN: 9780123864550
17. Shomar A, Barak O, Brenner N. Cancer progression as a learning process. *iScience* [Internet]. 2022;25(3). [citado a 29 de junho de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35265809/>
18. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020;5(1). [citado a 29 de junho de 2024]. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/32296047>
19. McCune JS. Rapid Advances in Immunotherapy to Treat Cancer. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;103(4):540–4. [citado a 14 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29527663/>
20. Liga Portuguesa Contra o Cancro. Métodos de tratamento [Internet]. Lisboa: Liga Portuguesa Contra o Cancro [citado a 14 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.ligacontracancro.pt/metodos-de-tratamento/>
21. Ogrinc N, Saudemont P, Takats Z, Salzet M, Fournier I. Cancer Surgery 2.0: Guidance by Real-Time Molecular Technologies. *Trends Mol Med* [Internet]. 2021;27(6):602–15. [citado a 14 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33965341/>
22. Nakamura H, Maeda H. Cancer Chemotherapy. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* [Internet]. 2023;401–27. [citado a 15 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>
23. Muthukutty P, Woo HY, Ragothaman M, Yoo SY. Recent Advances in Cancer Immunotherapy Delivery Modalities. *Pharmaceutics* [Internet]. 2023;15(2). [citado a 15 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9967630/>
24. Victoir B, Croix C, Gouilleux F, Prié G. Targeted Therapeutic Strategies for the Treatment of Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024;16(2). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/38275901>
25. Stroik S, Hendrickson EA. Telomere replication-When the going gets tough. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2020;94. [citado a 20 de julho de 2024]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32650286/>
26. Creighton HB, McClintock B. A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1931;17(8):492–7.
27. Chakravarti D, LaBella KA, DePinho RA. Telomeres: History, Health and Hallmarks of Aging. *Cell* [Internet]. 2021;184(2):306. [citado a 29 de janeiro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8081271/>
28. Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021;22(4):283–98. [citado a 29 de janeiro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33564154/>
29. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells* [Internet]. 2019;8(1). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669451/>

30. Palm W, De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2008;42:301–34. [citado 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680434/>
31. Lee J, Pellegrini M V. *Biochemistry, Telomere And Telomerase*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022 [citado a 30 de janeiro de 2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576429/>
32. Diaz Escarcega R, Marshall P, Tsvetkov AS. G-quadruplex DNA and RNA in cellular senescence. *Frontiers in Aging* [Internet]. 2024;5:1491389. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11496277/>
33. Xu Y, Komiyama M. G-Quadruplexes in Human Telomere: Structures, Properties, and Applications. *Molecules* [Internet]. 2023;29(1). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/38202757>
34. Baylie T, Jemal M, Baye G, Getinet M, Amare GA, Adugna A, et al. The role of telomere and telomerase in cancer and novel therapeutic target: narrative review. *Front Oncol* [Internet]. 2025;15:1542930. [citado a 20 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11947687/>
35. Jingwen B, Yaochen L, Guojun Z. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2017;14(4):348. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29372101/>
36. Olovnikov AM. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973;41(1):181–90.
37. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2010;75(13):1563–83. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21417995/>
38. Deng Y, Chang S. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest* [Internet]. 2007;87(11):1071–6. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17767195/>
39. Stewart SA, Weinberg RA. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2000;10(6):399–406. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11170862/>
40. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585–621.
41. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* [Internet]. 1985;43(2 Pt 1):405–13. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3907856/>
42. Udroui I, Marinaccio J, Sgura A. Many Functions of Telomerase Components: Certainties, Doubts, and Inconsistencies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(23). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36499514/>
43. Duong Nguyen TH. Structural biology of human telomerase: progress and prospects. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2021;49(5):1927–39. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34623385/>
44. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol* [Internet]. 2012;41(5):1561–9. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22941386/>
45. Hamma T, Ferré-D’Amaré AR. The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(2):805–9. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19917616/>

46. Hajj J El, Garsuault D, Bouyer C, Nguyen E, Hilal G, Ségal-Bendirdjian E, et al. Telomeres and Telomerase in Neuroblastoma. *Neuroblastoma - Current State and Recent Updates* [Internet]. 2017 [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/55855>
47. Nguyen THD, Tam J, Wu RA, Greber BJ, Toso D, Nogales E, et al. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature* [Internet]. 2018;557(7704):190–5. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29695869/>
48. Welfer GA, Freudenthal BD. Recent advancements in the structural biology of human telomerase and their implications for improved design of cancer therapeutics. *NAR Cancer* [Internet]. 2023;5(1). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36879683/>
49. Mitchell M, Gillis A, Futahashi M, Fujiwara H, Skordalakes E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010;17(4):513–8. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20357774/>
50. Wyatt HDM, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010;38(17):5609–22. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20460453/>
51. Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269(5228):1236–41.
52. Raghunandan M, Decottignies A. The multifaceted hTR telomerase RNA from a structural perspective: Distinct domains of hTR differentially interact with protein partners to orchestrate its telomerase-independent functions. *Bioessays* [Internet]. 2021;43(10). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34319611/>
53. Robinson NJ, Schiemann WP. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022;14(3). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35159075/>
54. Shepelev N, Dontsova O, Rubtsova M. Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications in Telomerase Biogenesis and Recruitment to Telomeres. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(5). [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36902458/>
55. Colebatch AJ, Dobrovic A, Cooper WA. TERT gene: its function and dysregulation in cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2019;72(4):281–4. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30696697/>
56. Shim HS, Iaconelli J, Shang X, Li J, Lan ZD, Jiang S, et al. TERT activation targets DNA methylation and multiple aging hallmarks. *Cell* [Internet]. 2024;187(15):4030–4042.e13. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38908367/>
57. Dogan F, Forsyth NR. Telomerase Regulation: A Role for Epigenetics. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(6):1–24. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802026/>
58. Klump BM, Schmidt JC. Advances in understanding telomerase assembly. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2023;51(6):2093–101. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38108475/>
59. Roake CM, Artandi SE. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020;21(7):384–97. [citado 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32242127/>

60. Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2017;86:439–60. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28141967/>
61. Gavory G, Balasubramanian S. PNA and Oligonucleotide Inhibitors of Human Telomerase. *Landes Bioscience, Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. [citado 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6469/>
62. Chen JLL, Podlevsky JD. Telomeres and Telomerase. *Hayat MA Encyclopedia of Cell Biology*. Vol. 1. Waltham (MA): Academic Press; 2016;1:418–25.
63. Cai SW, de Lange T. CST-Pol α /Primase: the second telomere maintenance machine. *Genes Dev* [Internet]. 2023;37(13–14):555–69. [citado a 22 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37495394/>
64. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2007;96(7):1020. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2360127/>
65. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet* [Internet]. 2013;29(9):513. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3896987/>
66. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 1997;33(5):787–91. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9282118/>
67. Hackett JA, Greider CW. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 2002 21:4 [Internet]. 2002;21(4):619–26. [citado a 26 de março de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1205061>
68. Liu M, Zhang Y, Jian Y, Gu L, Zhang D, Zhou H, et al. The regulations of telomerase reverse transcriptase (TERT) in cancer. *Cell Death & Disease* 2024 15:1 [Internet]. 2024;15(1):1–12. [citado a 5 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-024-06454-7>
69. Guo Y, Chen Y, Zhang L, Ma L, Jiang K, Yao G, et al. TERT Promoter Mutations and Telomerase in Melanoma. *J Oncol* [Internet]. 2022;2022:6300329. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9325578/>
70. Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med* [Internet]. 2001;33(2):123–9. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11327115/>
71. Yuan X, Larsson C, Xu D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* 2019 38:34 [Internet]. 2019;38(34):6172–83. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41388-019-0872-9>
72. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science* 2018 25:1 [Internet]. 2018;25(1):1–12. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-018-0422-8>
73. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:589929. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7717964/>
74. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet].

- 2000;16:653–99. [citado a 5 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653>
75. Ding D, Zhou J, Wang M, Cong YS. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *FEBS J* [Internet]. 2013;280(14):3205–11. [citado a 5 de abril de 2025]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.12258>
 76. Li Y, Tergaonkar V. Noncanonical functions of telomerase: Implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Res* [Internet]. 2014;74(6):1639–44. [citado a 25 de agosto de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24599132/>
 77. Rubtsova MP, Nikishin DA, Vyssokikh MY, Koriagina MS, Vasiliev A V., Dontsova OA. Telomere Reprogramming and Cellular Metabolism: Is There a Link? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024;25(19):10500. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11476947/>
 78. Chiodi I, Mondello C, Azzalin CM, Bailey SM, Zhu XD. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* [Internet]. 2012;2:133. [citado a 5 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3460319/>
 79. Liu H, Liu Q, Ge Y, Zhao Q, Zheng X, Zhao Y. hTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:22886. [citado 5 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4789728/>
 80. Gazzaniga FS, Blackburn EH. An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity. *Blood* [Internet]. 2014;124(25):3675–84. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25320237/>
 81. Saraswati AP, Relitti N, Brindisi M, Gemma S, Zisterer D, Butini S, et al. Raising the bar in anticancer therapy: recent advances in, and perspectives on, telomerase inhibitors. *Drug Discov Today* [Internet]. 2019;24(7):1370–88. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644618305452>
 82. Xu Y, Goldkorn A. Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer. *Genes* 2016, Vol 7, Page 22 [Internet]. 2016;7(6):22. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/7/6/22/htm>
 83. Ali JH, Walter M. Combining old and new concepts in targeting telomerase for cancer therapy: transient, immediate, complete and combinatory attack (TICCA). *Cancer Cell International* 2023 23:1 [Internet]. 2023;23(1):1–24. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-023-03041-2>
 84. Kumar N, Sethi G. Telomerase and hallmarks of cancer: An intricate interplay governing cancer cell evolution. *Cancer Lett* [Internet] 2023;578:216459. [citado a 7 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21621148/>
 85. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of Telomerase Activity in Human Cancer. *Journal of the Formosan Medical Association* [Internet] 2011;110(5):275–89. [citado a 7 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21621148/>
 86. Judasz E, Lisiak N, Kopczyński P, Taube M, Rubiś B. The Role of Telomerase in Breast Cancer’s Response to Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(21):12844. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9654063/>
 87. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase Activity in Small-Cell and Non–Small-Cell Lung Cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 1995;87(12):895–902. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/jnci/87.12.895>

88. Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Zhang Z. Telomere, telomerase and digestive cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 1999;5(4):334. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4695548/>
89. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *International Journal of Urology*. [Internet] 2017;24(10):730–4. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28543959/>
90. Alnafakh RAA, Adishesh M, Button L, Saretzki G, Hapangama DK. Telomerase and telomeres in endometrial cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2019;9(MAY):447009. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: www.frontiersin.org
91. Zisuh AV, Han TQ, Zhan SD. Expression of telomerase & its significance in the diagnosis of pancreatic cancer. *Indian J Med Res* [Internet] 2012;135(1):26. [citado a 6 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3307179/>
92. American Cancer Society. What Are Myelodysplastic Syndromes? [Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 14 de fevereiro de 2025 [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/myelodysplastic-syndrome/about/what-is-mds.html>
93. Armanios M, Greider CW. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 2005;70:205–8. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16869755/>
94. Kröger N, McLornan DP, Chalandon Y. Myeloproliferative Neoplasms. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 2023;695–705. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531464/>
95. Davison GM. Telomeres and telomerase in leukaemia and lymphoma. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2007;37(1):43–7. [citado a 13 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17766184/>
96. Aquilanti E, Kageler L, Wen PY, Meyerson M. Telomerase as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021;23(12):2004. [citado a 12 de abril de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8643448/>
97. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 1994;59:307–15. [citado a 7 de junho de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7587082/>
98. Andrews LG, Tollefsbol TO. Methods of Telomerase Inhibition. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2008;405:1. [citado 7 de junho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2423206/>
99. Guterres AN, Villanueva J. Targeting Telomerase for Cancer Therapy. *Oncogene* [Internet]. 2020;39(36):5811. [citado a 7 de junho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7678952/>
100. Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2020;122(2):157–67. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41416-019-0642-z>
101. Negrini S, De Palma R, Filaci G. Anti-Cancer Immunotherapies Targeting Telomerase. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020;12(8):2260. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7465444/>
102. Eckburg A, Dein J, Berei J, Schrank Z, Puri N. Oligonucleotides and microRNAs Targeting Telomerase Subunits in Cancer Therapy. *Cancers* 2020, Vol 12, Page 2337 [Internet]. 2020;12(9):2337. [citado a 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/9/2337/htm>

103. Corey DR. Telomeres and Telomerase: From Discovery to Clinical Trials. *Chem Biol* [Internet]. 2009;16(12):1219. [citado a 8 de junho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2810624/>
104. Chen X, Tang WJ, Shi JB, Liu MM, Liu XH. Therapeutic strategies for targeting telomerase in cancer. *Med Res Rev* [Internet]. 2020;40(2):532–85. [citado a 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31361345/>
105. Avendaño C, Menéndez JC. DNA intercalation and topoisomerase inhibition. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2023;325–87.
106. Lennox AL, Huang F, Behrs MK, González-Sales M, Bhise N, Wan Y, et al. Imetelstat, a novel, first-in-class telomerase inhibitor: Mechanism of action, clinical, and translational science. *Clin Transl Sci* [Internet]. 2024;17(11):e70076. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11571238/>
107. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies Targeting Telomerase Inhibition. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2008;41(2):194. [citado a 5 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2628964/>
108. Dansereau SJ, Cui H, Dartawan RP, Sheng J. The Plethora of RNA–Protein Interactions Model a Basis for RNA Therapies. *Genes (Basel)* [Internet]. 2025;16(1):48. [citado a 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11765398/>
109. Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, Leviskas B, Kuckovic A, Sanjali A, et al. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants* 2017, Vol 6, Page 15 [Internet]. 2017;6(1):15. [citado a 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/6/1/15/htm>
110. Sugarman ET, Zhang G, Shay JW. In Perspective: An Update on Telomere Targeting in Cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2019;58(9):1581. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6692182/>
111. Wu L, Fidan K, Um JY, Ahn KS. Telomerase: Key regulator of inflammation and cancer. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020;155:104726. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661820304254>
112. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2011;82(12):1807. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4082721/>
113. Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, et al. Inhibition of Intestinal Tumorigenesis in Apcmin/+ Mice by (–)-Epigallocatechin-3-Gallate, the Major Catechin in Green Tea. *Cancer Res* [Internet]. 2005;65(22):10623–31. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: </cancerres/article/65/22/10623/518745/Inhibition-of-Intestinal-Tumorigenesis-in-Apcmin>
114. Fernandes SG, Gala K, Khattar E. Telomerase inhibitor MST-312 and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation by promoting DNA damage. *Transl Oncol* [Internet]. 2022;27:101569. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9596868/>
115. Bryan C, Rice C, Hoffman H, Harkisheimer M, Sweeney M, Skordalakes E. Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. *Structure* [Internet]. 2015;23(10):1934. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4598299/>
116. Altamura G, degli Uberti B, Galiero G, De Luca G, Power K, Licenziato L, et al. The Small Molecule BIBR1532 Exerts Potential Anti-cancer Activities in Preclinical Models of Feline Oral Squamous Cell Carcinoma Through Inhibition of Telomerase Activity and

- Down-Regulation of TERT. *Front Vet Sci* [Internet]. 2021;7:620776. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: www.frontiersin.org
117. Tawfik HO, El-Hamaky AA, El-Bastawissy EA, Shcherbakov KA, Veselovsky A V., Gladilina YA, et al. New Genetic Bomb Trigger: Design, Synthesis, Molecular Dynamics Simulation, and Biological Evaluation of Novel BIBR1532-Related Analogs Targeting Telomerase against Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2022;15(4):481. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9025901/>
 118. Al-Karmalawy AA, Nafie MS, Shaldam MA, Elmaaty AA, Antar SA, El-Hamaky AA, et al. Ligand-Based Design on the Dog-Bone-Shaped BIBR1532 Pharmacophoric Features and Synthesis of Novel Analogues as Promising Telomerase Inhibitors with in Vitro and in Vivo Evaluations. *J Med Chem* [Internet]. 2023;66(1):777–92. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36525642/>
 119. Siteni S, Grichuk A, Shay JW. Telomerase in Cancer Therapeutics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2024;16(12):a041703. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/16/12/a041703.full>
 120. Zhou G, Liu X, Li Y, Xu S, Ma C, Wu X, et al. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(12):14925. [citado a 7 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4924762/>
 121. Awadasseid A, Ma X, Wu Y, Zhang W. G-quadruplex stabilization via small-molecules as a potential anti-cancer strategy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2021;139:111550. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221003358>
 122. Telomestatina – Conhecimento e Referências – Taylor & Francis [Internet]. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: https://taylorandfrancis.com/knowledge/Medicine_and_healthcare/Pharmaceutical_medicine/Telomestatin/
 123. Müller S, Sanders DA, Di Antonio M, Matsis S, Riou JF, Rodriguez R, et al. Pyridostatin analogues promote telomere dysfunction and long-term growth inhibition in human cancer cells. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2012;10(32):6537. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3700226/>
 124. Yang D, Okamoto K. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med Chem* [Internet]. 2010;2(4):619. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2886307/>
 125. Taetz S, Mürdter TE, Zapp J, Boettcher S, Baldes C, Kleideiter E, et al. Decomposition of the Telomere-Targeting agent BRACO19 in physiological media results in products with decreased inhibitory potential. *Int J Pharm* [Internet]. 2008;357(1–2):6–14. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517308000653>
 126. Figueiredo J, Mergny JL, Cruz C. G-quadruplex ligands in cancer therapy: Progress, challenges, and clinical perspectives. *Life Sci* [Internet]. 2024;340:122481. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320524000705>
 127. Sullivan HJ, Readmond C, Radicella C, Persad V, Fasano TJ, Wu C. Binding of Telomestatin, TMPyP4, BSU6037, and BRACO19 to a Telomeric G-Quadruplex-Duplex Hybrid Probed by All-Atom Molecular Dynamics Simulations with Explicit Solvent. *ACS Omega* [Internet]. 2018;3(11):14788–806. [citado a 2 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555989/>

128. Berardinelli F, Sgura A, Facchetti A, Leone S, Vischioni B, Ciocca M, et al. The G-quadruplex-stabilizing ligand RHPS4 enhances sensitivity of U251MG glioblastoma cells to clinical carbon ion beams. *FEBS Journal* [Internet]. 2018;285(7):1226–36. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: [/doi/pdf/10.1111/febs.14415](https://doi/pdf/10.1111/febs.14415)
129. Li G, Shen J, Cao J, Zhou G, Lei T, Sun Y, et al. Alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase in gliomas and its modulation mediated by CX-5461. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2018;37(1):78. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5891986/>
130. Li HX, He YM, Fei J, Guo M, Zeng C, Yan PJ, et al. The G-quadruplex ligand CX-5461: an innovative candidate for disease treatment. *Journal of Translational Medicine* 2025 23:1 [Internet]. 2025;23(1):1–21. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-025-06473-8>
131. Manaia MN, Chiorcea-Paquim AM. Cationic porphyrin TMPyP4 redox behaviour and interaction with nucleic acids: Towards a new methodology for screening porphyrin-based anticancer drugs. *Electrochim Acta* [Internet]. 2023;462:142749. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468623009271>
132. Zegers J, Peters M, Albada B. DNA G-quadruplex-stabilizing metal complexes as anticancer drugs. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* [Internet]. 2022;28(2):117. [citado a 12 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9981530/>
133. Fracchioni G, Vailati S, Grazioli M, Pirota V. Structural Unfolding of G-Quadruplexes: From Small Molecules to Antisense Strategies. *Molecules* [Internet]. 2024;29(15):3488. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11314335/>
134. Kailashiya C, Sharma HB, Kailashiya J. Telomerase based anticancer immunotherapy and vaccines approaches. *Vaccine* [Internet]. 2017;35(43):5768–75. [citado a 7 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893481/>
135. Vahidi S, Zabeti Touchaei A. Telomerase-based vaccines: a promising frontier in cancer immunotherapy. *Cancer Cell International* [Internet]. 2024;24(1):1–17. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-024-03624-7>
136. Teixeira L, Medioni J, Garibal J, Adotevi O, Doucet L, Durey MAD, et al. A first-in-human phase I study of INVAC-1, an optimized human telomerase DNA vaccine in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2020;26(3):588–97. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31558479/>
137. Tao HY, Zhao CY, Wang Y, Sheng WJ, Zhen YS. Targeting Telomere Dynamics as an Effective Approach for the Development of Cancer Therapeutics. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2024;19:3805. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11069074/>
138. Wang Y, Zhang X, Chen G, Shao M. Clinical research progress of telomerase targeted cancer immunotherapy: a literature review. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2024;13(7):3904–21. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://tcr.amegroups.org/article/view/88487/html>
139. Inderberg-Suso EM, Trachsel S, Lislerud K, Rasmussen AM, Gaudernack G. Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012;1(5):670. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3429571/>

140. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* [Internet]. 2000;60(4):1028–34. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10706120/>
141. Immuno-Oncology News. Telomelysin (OBP-301) [Internet]. Immuno-Oncology News; 20 de dezembro de 2017[citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://immuno-oncologynews.com/telomelysin-obp-301/>
142. Chang J, Zhao X, Wu X, Guo Y, Guo H, Cao J, et al. A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte- macrophage colony-stimulating factor: Armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2009;8(8):676–82. [citado a 19 de julho de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19242097/>
143. U.S. Food and Drug Administration. The Drug Development Process [Internet]. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration; 4 de janeiro de 2018 [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>
144. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (1979) [Internet]. 1994;266(5193):2011–5. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7605428/>
145. University of Cincinnati. Trial Phases 1, 2 & 3 Defined - Clinical Research Management (CRM) | Research | Psychiatry and Behavioral Neuroscience | UC Medicine; Cincinnati (OH): University of Cincinnati [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://med.uc.edu/depart/psychiatry/research/clinical-research/crm/trial-phases-1-2-3-defined>
146. Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, et al. In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: A novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res* [Internet]. 2005;65(17):7866–73. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16140956/>
147. Jackson SR, Zhu CH, Paulson V, Watkins L, Dikmen ZG, Gryaznov SM, et al. Antiadhesive effects of GRN163L - An oligonucleotide N3'→P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase. *Cancer Res* [Internet]. 2007;67(3):1121–9. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283146/>
148. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2006;96(1):73–81. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16319992/>
149. Hochreiter AE, Xiao H, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Miller KD, Badve S, et al. Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2006;12(10):3184–92. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16707619/>
150. Gomez-Millan J, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Mendonca MS, Herbert BS. Specific telomere dysfunction induced by GRN163L increases radiation sensitivity in breast cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2007;67(3):897–905. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17175117/>
151. Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW, Gryaznov SM. Telomerase targeted oligonucleotide thio-phosphoramidates in t24-luc bladder cancer cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2008;104(2):444–52. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044713/>

152. Marian CO, Cho SK, Mcellin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, et al. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2010;16(1):154–63. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20048334/>
153. Thompson PA, Drissi R, Muscal JA, Panditharatna E, Fouladi M, Ingle AM, et al. A Phase 1 Trial of Imetelstat in Children with Refractory or Recurrent Solid Tumors: A Children’s Oncology Group Phase 1 Consortium Study (ADV1112). *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013;19(23):6578. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4079262/>
154. Burchett KM, Yan Y, Ouellette MM. Telomerase Inhibitor Imetelstat (GRN163L) Limits the Lifespan of Human Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(1):e85155. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3883701/>
155. Koziel JE, Herbert BS. The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2015;149(3):607. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4667948/>
156. Baerlocher GM, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, et al. Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015;373(10):920–8. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26332546/>
157. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, Finke CM, et al. A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015;373(10):908–19. [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26332545/>
158. Salloum R, Hummel TR, Kumar SS, Dorris K, Li S, Lin T, et al. A molecular biology and phase ii study of imetelstat (grn163l) in children with recurrent or refractory central nervous system malignancies: a pediatric brain tumor consortium study. *J Neurooncol* [Internet]. 2016;129(3):443. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5288808/>
159. Frink RE, Peyton M, Schiller JH, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD. Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(22):31639–51. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192120/>
160. Mascarenhas J, Komrokji RS, Palandri F, Martino B, Niederwieser D, Reiter A, et al. Randomized, Single-Blind, Multicenter Phase II Study of Two Doses of Imetelstat in Relapsed or Refractory Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2021;39(26):2881–92. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34138638/>
161. Platzbecker U, Santini V, Fenaux P, Sekeres MA, Savona MR, Madanat YF, et al. Imetelstat in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes who have relapsed or are refractory to erythropoiesis-stimulating agents (IMerge): a multinational, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* [Internet]. 2024;403(10423):249–60. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S0140673623017245>
162. Mender I, Gryaznov S, Shay JW. A novel telomerase substrate precursor rapidly induces telomere dysfunction in telomerase positive cancer cells but not telomerase silent normal

- cells. *Oncoscience* [Internet]. 2015;2(8):693. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4580061/>
163. Mender I, Gryaznov S, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Cancer Discov* [Internet]. 2015;5(1):82–95. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25516420/>
 164. Sengupta S, Sobo M, Lee K, Kumar SS, White AR, Mender I, et al. Induced telomere damage to treat telomerase expressing therapy-resistant pediatric brain tumors. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2018;17(7):1504–14. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: [/mct/article/17/7/1504/92527/Induced-Telomere-Damage-to-Treat-Telomerase](https://mct/article/17/7/1504/92527/Induced-Telomere-Damage-to-Treat-Telomerase)
 165. Mender I, LaRanger R, Luitel K, Peyton M, Girard L, Lai TP, et al. Telomerase-Mediated Strategy for Overcoming Non–Small Cell Lung Cancer Targeted Therapy and Chemotherapy Resistance. *Neoplasia* [Internet]. 2018;20(8):826. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6037876/>
 166. Mender I, Zhang A, Ren Z, Han C, Deng Y, Siteni S, et al. Telomere Stress Potentiates STING-Dependent Anti-tumor Immunity. *Cancer Cell* [Internet]. 2020;38(3):400–411.e6. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S1535610820302701>
 167. Mender I, Girotti R, Gryaznov S. Novel telomere-targeting dual-pharmacophore dinucleotide prodrugs for anticancer therapy. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2025;53(12). [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaf591>
 168. Gurung RL, Lim SN, Low GKM, Hande MP. MST-312 alters telomere dynamics, gene expression profiles and growth in human breast cancer cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics* [Internet]. 2015;7(4–6):283–98. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26022559/>
 169. Morais K da S, Arcanjo D da S, de Faria Lopes GP, da Silva GG, da Mota THA, Gabriel TR, et al. Long-term in vitro treatment with telomerase inhibitor MST-312 induces resistance by selecting long telomeres cells. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2019;37(4):273–80. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31012504/>
 170. Sameni S, Viswanathan R, Ng GYQ, Martinez-Lopez W, Hande MP. Telomerase Inhibition by MST-312 Sensitizes Breast Cancer Cells to the Anti-cancer Properties of Plumbagin. *Genome Integr* [Internet]. 2023;14:e20230002. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11102071/>
 171. Ameri Z, Ghiasi S, Farsinejad A, Hassanshahi G, Ehsan M, Fatemi A. Telomerase inhibitor MST-312 induces apoptosis of multiple myeloma cells and down-regulation of anti-apoptotic, proliferative and inflammatory genes. *Life Sci* [Internet]. 2019;228:66–71. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31029779/>
 172. Zhou C, Liu S. Evaluation of the efficacy of MST-312, as a telomerase inhibitor, in the treatment of patients with multiple myeloma after stem cell transplantation. *Cell Mol Biol* [Internet]. 2021;67(4):115–20. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35809296/>
 173. Ding X, Cheng J, Pang Q, Wei X, Zhang X, Wang P, et al. BIBR1532, a Selective Telomerase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Through Increasing Telomere Dysfunction and ATM/CHK1 Inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2019;105(4):861–74. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31419512/>

174. Bao Y, Pan Z, Zhao L, Qiu J, Cheng J, Liu L, et al. BIBR1532 combined with radiotherapy induces ferroptosis in NSCLC cells and activates cGAS-STING pathway to promote anti-tumor immunity. *J Transl Med* [Internet]. 2024;22(1). [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38816831/>
175. Rafat A, Dizaji Asl K, Mazloumi Z, Movassaghpour AA, Talebi M, Shanebandi D, et al. Telomerase inhibition on acute myeloid leukemia stem cell induced apoptosis with both intrinsic and extrinsic pathways. *Life Sci* [Internet]. 2022;295. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35176279/>
176. Rafat A, Dizaji Asl K, Mazloumi Z, Talebi M, Nozad Charoudeh H. Natural killer cells in combination with the inhibition of telomerase induced apoptosis in Acute Myeloid Leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2025;42:102027. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580825001141>
177. Zhang Y, Yang X, Zhou H, Yao G, Zhou L, Qian C. BIBR1532 inhibits proliferation and enhances apoptosis in multiple myeloma cells by reducing telomerase activity. *PeerJ* [Internet]. 2023;11. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37953768/>
178. Mazloumi Z, Rafat A, Dizaji Asl K, Nozad Charoudeh H. A combination of telomerase inhibition and NK cell therapy increased breast cancer cell line apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2023;640:50–5. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36502631/>
179. Wang Q, Li QR, Xu L, Yuan ZC, Liu X, Tang MJ, et al. BIBR1532 inhibits proliferation and metastasis of esophageal squamous cancer cells by inducing telomere dysregulation. *World J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2025;17(1). [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39817136/>
180. Geron Corporation. Our history [Internet]. Menlo Park (CA): Geron Corporation [citado a 3 de setembro de 2025]. Disponível em: https://www.geron.com/about/history/?utm_source=chatgpt.com
181. Röth A, Harley CB, Baerlocher GM. Imetelstat (GRN163L) - Telomerase-based cancer therapy. *Recent Results in Cancer Research* [Internet]. 2010;184:221–34. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20072842/>
182. Indiana University. Study Details | NCT01265927 | A Study Inhibiting Telomerase to Reverse Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer [Internet]. *ClinicalTrials.gov* [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01265927>
183. Bidikian A, Bewersdorf JP, Kewan T, Podoltsev NA, Stahl M, Zeidan AM. Imetelstat in myeloid malignancies: current data and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2025;25(5):517–28. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14737140.2025.2482721>
184. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves imetelstat for low- to intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with transfusion-dependent anemia [Internet]. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration; 6 de junho de 2024 [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-imetelstat-low-intermediate-1-risk-myelodysplastic-syndromes-transfusion-dependent>
185. European Medicines Agency. Rytelo [Internet]. (EMA) Amsterdam: European Medicines Agency; [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rytelo>

186. Mascarenhas J, Harrison CN, Kiladjian JJ, Komrokji RS, Koschmieder S, Vannucchi AM, et al. Imetelstat in intermediate-2 or high-risk myelofibrosis refractory to JAK inhibitor: IMPactMF phase III study design. *Future Oncology*. 2022;18(22):2393–402.
187. GCP-Service International West GmbH. Study Details | NCT05583552 | Study to Evaluate Imetelstat in Patients With High-Risk MDS or AML Failing HMA-based Therapy (Impress) [Internet]. *ClinicalTrials.gov* 13 de junho de 2023 [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05583552>
188. Geron Corporation. Study Details | NCT05371964 | A Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Activity of Imetelstat in Combination With Ruxolitinib in Participants With Myelofibrosis [Internet]. *ClinicalTrials.gov*; 5 de maio de 2022 [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05371964?term=imetelstat&page=2&rank=15>
189. Mascarenhas J, Bradley TJ, Scott BL, Yimer HA, Dougherty S, Peng L, et al. IMproveMF update: Phase 1/1B trial of imetelstat (IME)+ruxolitinib (RUX) in patients (pts) with intermediate (INT)-1, INT-2, or high-risk (HR) myelofibrosis (MF). *Journal of Clinical Oncology*. 2025;43(16_suppl):6515–6515.
190. National Institutes of Health. Study Details | NCT06247787 | A Study to Find the Highest Dose of Imetelstat in Combination With Fludarabine and Cytarabine for Patients With AML, MDS or JMML That Has Come Back or Does Not Respond to Therapy [Internet]. *ClinicalTrials.gov* [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06247787?term=imetelstat&page=3&rank=23>
191. MAIA Biotechnology. Ateganosine (THIO) [Internet]. Chicago: MAIA Biotechnology; [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://maiabiotech.com/pipeline/thio/>
192. Mender I, Gryaznov S, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW. Induction of Telomere Dysfunction Mediated By the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine. *Cancer Discov* [Internet]. 2014;5(1):82. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4293221/>
193. MAIA Biotechnology. Study Details | NCT05208944 | THIO Sequenced With Cemiplimab in Advanced NSCLC [Internet]. *ClinicalTrials.gov* [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05208944>
194. MAIA Biotechnology. Study Details | NCT06908304 | A Phase III Study With THIO + Cemiplimab vs Chemotherapy as 3rd Line Treatment in Advanced/Metastatic NSCLC [Internet]. *ClinicalTrials.gov* [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06908304?term=ateganosine&rank=1>
195. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Hou Z, Ju J, Lu G. Possible mechanisms of the cancer-preventive activities of green tea. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2006;50(2):170–5. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16425280/>
196. Kciuk M, Alam M, Ali N, Rashid S, Głowacka P, Sundaraj R, et al. Epigallocatechin-3-Gallate Therapeutic Potential in Cancer: Mechanism of Action and Clinical Implications. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 5246 [Internet]. 2023;28(13):5246. [citado a 4 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/13/5246/html>
197. Asl KD, Rafat A, Movassaghpour AA, Charoudeh HN, Nasrabadi HT. The Effect of Telomerase Inhibition on NK Cell Activity in Acute Myeloid Leukemia. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2021;13(1):170. [citado a 5 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9871272/>
198. Hemann MT, Greider CW. Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(22):4474. [citado a 6 de setembro de 2025] Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC113886/>

199. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* [Internet]. 1998; 16(13):1723–30. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9582020/>
200. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* [Internet]. 1997;91(1):25–34. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9335332/>
201. Aquilanti E, Barkho S, Bozinov V, Kageler L, Garrity-Janger M, Mesleh MF, et al. High-Throughput Screening Tool to Identify Small Molecule Inhibitors of Telomerase. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2025;20:1707–14. [citado a 7 de setembro de 2025]. Disponível em: [/doi/pdf/10.1021/acscchembio.5c00244?ref=article_openPDF](https://doi/pdf/10.1021/acscchembio.5c00244?ref=article_openPDF)
202. Jiang J, Wang Y, Sušac L, Chan H, Basu R, Zhou ZH, et al. Structure of Telomerase with Telomeric DNA. *Cell* [Internet]. 2018;173(5):1179-1190.e13. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775593/>
203. Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* [Internet]. 2008;455(7213):633–7. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18758444/>
204. Ghanim GE, Fountain AJ, van Roon AMM, Rangan R, Das R, Collins K, et al. Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. *Nature* 2021;593:7859 [Internet]. 2021;593(7859):449–53. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03415-4>
205. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):217–25. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15671549/>
206. Min J, Wright WE, Shay JW. Alternative lengthening of telomeres can be maintained by preferential elongation of lagging strands. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017;45(5):2615–28. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082393/>
207. Jäger K, Walter M. Therapeutic Targeting of Telomerase. *Genes (Basel)* [Internet]. 2016;7(7):39. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4962009/>
208. Liu T, Liang X, Li B, Björkholm M, Jia J, Xu D. Telomerase reverse transcriptase inhibition stimulates cyclooxygenase 2 expression in cancer cells and synergizes with celecoxib to exert anti-cancer effects. *Br J Cancer* [Internet]. 2013;108(11):2272–80. [citado a 6 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc2013208>
209. Mishra A, Patel TN. Telomerase in cancer- ongoing quest and future discoveries. *Molecular Biology Reports* [Internet]. 2025;52(1):1–15. [citado a 7 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-025-10251-6>
210. Kamal S, Junaid M, Ejaz A, Bibi I, Akash MSH, Rehman K. The secrets of telomerase: Retrospective analysis and future prospects. *Life Sci* [Internet]. 2020;257:118115. [citado a 7 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520308663>

