

FERRITINA E TELOMERASE COMO MARCADORES TUMORAIS

Ferritina And Telomerase As Tumor Markers

Arianne Jung Kluck

Gabriela Strapação

Kayse Mayara Leal

Laiane Fernandes

Mayara Amorim

RESUMO

Marcadores tumorais ou biológicos são macromoléculas que, na maioria das vezes são proteínas ou pedaço delas, isto inclui proteínas citoplasmáticas, antígenos de superfície celular, enzimas e hormônios presentes em tumores, sangue e nos demais líquidos biológicos; isto acontece na presença de crescimento ou alteração de células neoplásicas. Os marcadores tumorais são mais utilizados na triagem em casos específicos, como em grupos de alto risco; diagnóstico diferencial; avaliação prognóstica da doença; monitoramento, tratamento oncológico e também auxilia no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento. Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imunoistoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogênese, genes supressores de tumores e alterações genéticas. Entre os marcadores tumorais está a telomerase, um complexo enzimático ribonucleoprotéico, que atua na replicação do DNA telomérico durante a fase S e mantém a estrutura da sequência telomérica, promovendo a formação de proteínas que protegem as extremidades dos cromossomos. Outro marcador tumoral é a ferritina, que se caracteriza por um complexo protéico hidrossolúvel de ferro de peso molecular 465.000, constituído de uma esfera proteica externa, a apoferritina. O presente artigo tem como objetivo relatar, através de um levantamento bibliográfico, a atuação da ferritina e da telomerase como marcadores tumorais no diagnóstico laboratorial. O uso da ferritina para indicar um prognóstico está sendo muito usado, pois quando o nível aumenta o prognóstico é pior especialmente em doenças tardias, onde são usados para acompanhar o tratamento de neoplasias, pois quando o valor retorna ao normal é visto que o tratamento está apresentando efeitos positivos. O método de análise da ferritina é quantitativo, feita a partir do soro de um paciente, sendo um teste imunológico turbidimétrico, para o uso de diagnóstico in vitro. Determina o ponto final da concentração da ferritina, pela fotometria da reação antígeno-anticorpo, entre partículas de látex marcadas com anticorpo anti-ferritina e ferritina presente na amostra. A concentração de ferritina na amostra é proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria. O aparecimento de células malignas pode ser expresso por níveis alterados da telomerase, onde sua avaliação está apresentando elevada importância já que em 80% dos casos é possível usa-la para auxiliar no diagnóstico do câncer. Essa metodologia baseada na identificação está sendo muito usada para avaliar casos de câncer de bexiga, pois essa proteína apresenta baixa expressão de células eucarióticas normais e sua presença é independente do estágio ou do grau do tumor vesical, neoplasias do trato biliar, pulmão, cérebro e com especificidade de 93% para o diagnóstico e prognóstico de câncer de mama. A determinação da telomerase é feita a partir da PCR, utilizando indicadores específicos no RNAm no gene ativador da telomerase, podendo verificar o grau de expressão pela quantidade de RNAm presente, sendo esta uma avaliação proporcional. Outro método que pode ser usado é o TRAP, (ensaio do protocolo da amplificação repetida da telomerase), e as variações desse ensaio são os métodos mais comumente para o monitoramento da atividade telomerase. Pode-se concluir, com base na revisão bibliográfica realizada, que os marcadores tumorais devem ser utilizados como diagnóstico apenas quando associados

a outros exames. Entretanto, de forma geral, os marcadores tumorais podem auxiliar no acompanhamento do câncer e também podem ajudar o médico a planejar o tratamento apropriado, dado que em alguns tipos de câncer os níveis dos marcadores tumorais refletem o estágio da doença e/ou o prognóstico do paciente.

Palavras-chave: diagnóstico laboratorial; ferritina; marcadores tumorais; telomerase.

INTRODUÇÃO

Marcadores tumorais ou biológicos são macromoléculas na maioria das vezes são proteínas ou pedaço delas, isto inclui proteínas citoplasmáticas, antígenos de superfície celular e enzimas e hormônios presentes em tumores, sangue e nos demais líquidos biológicos; isto acontece na presença de crescimento ou alteração de células neoplásicas. O marcador tumoral pode ser produzido pelo corpo ou pelo próprio tumor em resposta à presença do câncer (ALMEIDA, 2007).

Além do marcador tumoral, podem ser combinados outros tipos de exames como diagnóstico por imagem e biopsia. Os marcadores tumorais são mais utilizados na triagem em casos específicos, como em grupos de alto risco; diagnóstico diferencial; avaliação prognóstica da doença; monitoramento e tratamento oncológico e também auxilia no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento. Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imunoistoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogênese, genes supressores de tumores e alterações genéticas. Estes marcadores também tem a função de avaliar periodicamente durante o tratamento de câncer, se houver uma diminuição no nível do marcador tumoral ou o retorno ao nível normal pode ser um indicativo que o câncer está tendo um resultado positivo para o tratamento, senão houver nenhuma mudança ou aumento é um indicativo que o câncer estabilizou ou não está respondendo ao tratamento. Os marcadores também podem ser medidos logo após o tratamento para verificar se há alguma possibilidade do retorno da doença (ALMEIDA, 2007; SALDANHA, 2009).

Entre os marcadores tumorais está a telomerase, um complexo enzimático ribonucleoprotéico, que atua na replicação do DNA telomérico durante a fase S e mantém a estrutura da sequência telomérica, promovendo a formação de proteínas que

protegem as extremidades dos cromossomos. Essa proteção do DNA ocorre pela adição de repetidas sequências não codificadoras TTAGGG no final dos cromossomos. Muitas células humanas proliferativas, com exceção das células-tronco, são deficientes de telomerase, seus telômeros diminuem a cada divisão celular até que ocorra o término permanente do ciclo celular. A telomerase difere de outros marcadores moleculares por apresentar praticamente uma expressão universal na maior parte dos casos de tumores teciduais (ALBERTS, 2010; ARAÚJO, 2013; BOTCHKINA, 2005).

Outro marcador tumoral é a ferritina, que se caracteriza por um complexo proteico hidrossolúvel de ferro de peso molecular 465.000, constituído de uma esfera proteica externa, a apoferritina. Algum ferro obtido pelo organismo através da dieta é armazenado nas células reticuloendoteliais, como ferritina e hemossiderina, em quantidades diversas, e uma pequena quantidade desta está presente na circulação sanguínea, conforme a disponibilidade de ferro no organismo. Sendo assim, na sobrecarga de ferro há aumento da ferritina tecidual, enquanto que na deficiência de ferro, a ferritina está baixa. Os níveis elevados de ferritina sérica sem aumento correspondente dos depósitos de ferro são observados em pacientes com neuroblastoma, doença de Hodgkin e leucemias (BIBLIOMED, 2013; HOFFBRAND, 2013). O presente artigo tem como objetivo relatar através de um levantamento bibliográfico, a atuação da ferritina e da telomerase como marcadores tumorais no diagnóstico laboratorial.

FERRITINA E TELOMERASE

Para realizar a determinação da ferritina são realizadas as técnicas baseadas em Imunoturbidimetria na qual é um método quantitativo onde é capaz de medir a diminuição de luz ao passar por um complexo antígeno e anticorpo, onde mede a absorção de luz sendo usado para medir a concentração plasmática da ferritina, podendo assim visualizar as reservas de ferro do corpo já que essa proteína é de muita importância para o armazenamento de ferro, onde aparece em quantidades baixas no soro, podendo se dizer que sua concentração normal em indivíduos saudáveis está

correlacionada com a quantidade de ferro disponível e armazenada no corpo (NAOUM, 2012).

O método é usado com o intuito de ocorrer uma ligação entre antígeno e anticorpo e para isso é usado à partícula de látex estabilizada e sensibilizada com anticorpos anti-ferritina humana onde são aglutinadas pela ferritina presente na amostra. A intensidade da aglutinação é medida em absorbância e esta relacionada à quantidade de ferritina, tendo uma concentração obtida através da curva de calibração (BIOCLIN).

O método de análise da ferritina é quantitativo, feita a partir do soro de um paciente, sendo um teste imunológico turbidimétrico, para o uso de diagnóstico in vitro. Determina o ponto final da concentração da ferritina, pela fotometria da reação antígeno-anticorpo, entre partículas de látex marcadas com anticorpo anti-ferritina e ferritina presente na amostra. A concentração de ferritina na amostra é proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria (BULA: BIOCLIN).

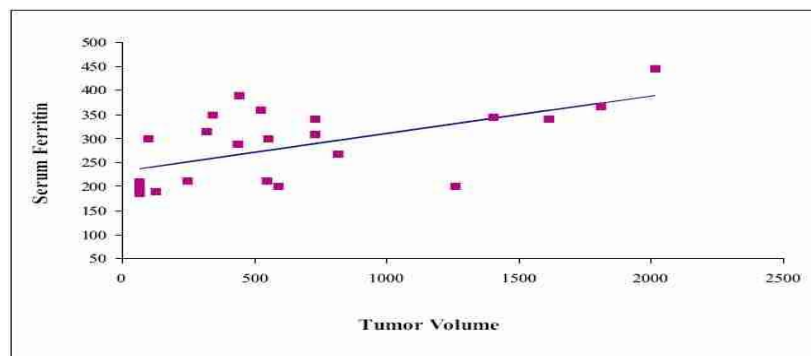
Antes de iniciar o teste deve fazer o preparo dos reagentes, o reagente de trabalho se mistura 2 mL de Tampão (3) + 1 mL de Látex Ferritina e o padrão de uso se adiciona o padrão liofilizado + 3 mL de água destilada. Se ajustar o Zero de absorbância do equipamento com água deionizada em 540 nm; Homogeneizar bem o Reagente de Trabalho antes do uso. E separa dois tubos (tubo padrão e tubo teste) no tubo padrão se adiciona 1000 µL de reagente de trabalho, mais 30 µL de padrão de uso, no tubo teste se adiciona 1000 µL de reagente de trabalho e 30 µL de soro. Adiciona-se no banho-maria a 37°C por, após o banho-maria se faz a leitura fotométrica do padrão e teste em 540 nm, espera 5 minutos e faz novamente a leitura em 540 nm do padrão e do teste. Após este processo, se faz o cálculo, liberando em µg/L (BIOCLIN, DOLES).

E assim após a curva pode-se obter resultados que serão comparados com resultados impostos pelos valores de referência, onde pessoas saudáveis apresentam esses valores dentro do padrão, mas os valores de ferritina podem estar elevados ou diminuídos onde, a baixo do que estipula a referência indica uma baixa carência de ferro, o que pode ser visualizados em anemias ferropriva, já sua elevação indica o excesso de ferro que pode ocorrer em pacientes que passaram por transfusões ou que apresentam neoplasias, como leucemias, linfomas, doença de Hodgkin, carcinomas de mama,

fígado, pulmão, cólon e próstata, por isso é usado como marcadores tumorais quando apresentam elevação (BULAS: BIOCLIN, DOLES).

Deste modo o uso da ferritina para indicar um prognóstico está sendo muito usado, pois quando o nível aumenta o prognóstico é pior especialmente em doenças tardias, um estudo realizado por Goswami et al, 2005, demonstrou a relação entre a proteína e carcinomas renais onde existe uma relação do aumento da ferritina e o volume do tumor como mostra na Figura 1, já níveis mais baixos de ferritina indicam um melhor prognóstico, onde são usados para acompanhar o tratamento de neoplasias, pois quando o valor retorna ao normal é visto que o tratamento está apresentando efeitos positivos (BIBLIOMED, 2013; GOSWAMI, 2005).

Figura 1 - Relação entre a Ferritina e o Tumor renal



Fonte: <http://medind.nic.in/ici/to5/i4/icit05i4p197.htm>

Com relação à telomerase, o uso da PCR determina a expressão do gene que codifica a porção catalítica da telomerase conhecida como hTERT, a partir do cDNA obtido, onde essa técnica realiza a multiplicação de uma parte específica do DNA a qual se deseja avaliar onde essa multiplicação ocorre através de temperaturas modificadas, portanto ocorre processos de desnaturação das cadeias do DNA, depois ocorre o anelamento dos primers onde é possível detectar a sequência que será amplificada, e depois a temperatura passa ser como é conhecida de temperatura específica da enzima, e por fim o ciclo da PCR é reiniciada novamente, portanto será possível determinar a atividade da telomerase. Outra técnica descrita é utilizando o TRAP, onde de acordo com Parsons (2003), é realizado através de um extrato tecidual suspeito onde é exposto a

um pequeno primer de DNA, pois se espera que com a telomerase ocorra uma extensão de sequência telomérica a partir do primer, onde o volume da banda é visto por densidade (PARSONS, 2003).

A determinação da telomerase é feita a partir da PCR, utilizando indicadores específicos no RNAm no gene ativador da telomerase, podendo verificar o grau de expressão pela quantidade de RNAm presente, sendo esta uma avaliação proporcional. A PCR se tem três etapas, a desnaturação onde o DNA genômico contendo a sequência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento a cerca de 95°C por cerca de 30 segundos. A dupla fita é aberta, tornando-se uma fita única. A segunda etapa é a de hibridização, onde após a separação das fitas, um par de iniciadores ou primers (uma fita de DNA específica para o gene que se quer estudar que no caso será a da telomerase) complementam a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. Ou seja, um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro é complementar à sequência na outra fita. O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se anexam a fita. Essa etapa ocorre a uma temperatura de 60°C. A terceira fase é a de polimerização, tendo o molde identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então se tem novamente a duplicação da fita de DNA (PARSONS, 2003).

Outro método que pode ser usado é o TRAP, (ensaio do protocolo da amplificação repetida da telomerase), e as variações desse ensaio são os métodos mais comumente para o monitoramento da atividade telomerase. O ensaio TRAP, é um ensaio com dois estágios, baseado em PCR. No primeiro estágio, a telomerase acrescenta repetições de 5'-TTAGGG-3' ao final de um primer sintético (denominado primer TS) que apresenta uma sequência tipo telômero. No segundo estágio, os produtos oligonucleotídeos estendidos são amplificados com uso de um primer reverso (denominado primer CX), que é complementar às sequências repetidas. Quando visualizadas por autorradiografia, um teste positivo com o ensaio TRAP revela uma sequência de bandas diferindo em 6 pb, do comprimento da repetição hexamérica 5'-TTAGGG-3'. O volume da banda pode ser quantificado por densitometria, imagens obtidas por fosforescência ou por fluorescência após a incorporação durante a amplificação ou depois da coloração com SYBR Green. É um ensaio sensível e específico

para a atividade telomerase em amostras de tumores, mas. Em resumo se tem como material um extrato tecidual suspeito que é exposto a um pequeno primer de DNA, sendo esperado que na presença da telomerase no extrato haja extensão de uma sequência telomérica a partir do primer. Para detecção da atividade telomérica, o conjunto é, então, amplificado por PCR e separado em eletroforese em gel. Para confirmarmos a presença de atividade telomérica, o gel deve revelar um crescendo de bandas diferindo de seis pares de bases cada uma (equivalente às repetições TTAGGG). É possível determinar o volume de cada banda por densitometria, definindo-se, então, o grau de expressão (PARSONS, 2003; HESS, 2002; LEMOS, 2015).

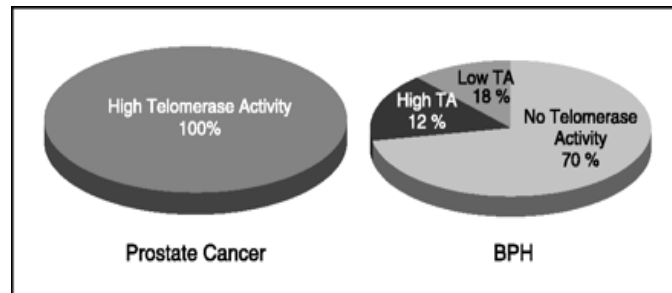
Porém é importante ressaltar que existem limitações ao avaliar a telomerase pelo método de TRAP onde o resultado tem que ser gerando no máximo 24 horas além da atividade ser instável e ser facilmente destruída pela RNase, e também deve existir um cuidado com a coleta de amostra e requer o uso de radioatividade e eletroforese onde ao ser obtido os produtos deve-se ser visualizados através da separação a partir da eletroforese em gel de agarose onde este é um método capaz de separar fragmentos através do seu tamanho já que as cadeias formadas serão separadas por corrente elétrica, e assim é possível distinguir as cadeias pesadas das cadeias leves (VIEIRA, 2011).

Por fim ao obter essa enzima através dos métodos descritos é possível obter como resultados uma análise dos valores encontrados por ela, onde atualmente a telomerase vem sendo muito estudada para determinar a presença e o acompanhamento de doenças, pois em paciente que apresentam uma diminuição das telomerasas indicam sintomas graves de doenças como a disceratose congênita na qual essa é uma doença que causa hiperpigmentação da pele. Porém além da diminuição das telomerasas há também a possibilidade de mutações nos genes que serão responsáveis por forma-la onde ocorre em paciente que apresentam fibrose pulmonar idiopática, e a partir dessas mutações associadas a essa proteína surgiu à proposta de avalia-la como marcador tumoral, pois as neoplasias surgem de células tumorizadas que passaram por um processo de divisão e expansão celular, logo estudos demonstram que há influencia da atividade da telomerase nos genes mutados e que ocasionam essa patologia (BORGES, 2005).

E ao ocorrer mutações genéticas celulares que irão originar células tumorais, ocorrem alterações inesperadas como a supressão no silenciamento da telomerase, onde pode contribuir para transformações malignas já que as células cancerígenas que são as precursoras acabam permitindo a ativação de vias metabólicas gerando a imortalização celular, assim a telomerase acaba por atingir um tamanho elevado, ocorrendo o processo de oncogenes fazendo com que as células ganhem a capacidade de se multiplicar e perca sua capacidade de morrer, logo ocorre uma instabilidade genética com consequência de novas mutações como, por exemplo, translocações e deleções (BORGES, 2005).

Portanto o aparecimento de células malignas pode ser expresso por níveis alterados da telomerase, onde sua avaliação está apresentando elevada importância já que em 80% dos casos é possível usa-la para auxiliar no diagnóstico do câncer. A sua identificação está sendo muito usada para avaliar casos de câncer de bexiga, pois essa proteína apresenta baixa expressão de células eucarióticas normais e sua presença é independente do estágio ou do grau do tumor vesical, onde é possível quantificar usando amostras de urina ou até mesmo de tecido pois apresentam uma sensibilidade e especificidade elevada para diagnóstico de tumores uroteliais da bexiga. Mas a telomerase também está sendo indicado para o uso de outros tumores como neoplasias do trato biliar, pulmão, cérebro e com especificidade de 93% para o diagnóstico e prognóstico de câncer de mama, e até mesmo câncer de próstata pode ser avaliada pela telomerase, onde estudos foram realizados por Botchkina et al., 2005, na qual demonstram a atividade desta comparando com as hiperplasia prostáticas benignas como mostra na Figura 2, e também o uso laboratorial desse marcador se aplica a presença de processos inflamatórios que gera resultados falsos positivos em estudos de lisados celulares (ALMEIDA, 2007; BOTCHKINA et al., 2005).

Figura 2 - Gráfico da Telomerase e o Câncer de Próstata



Fonte: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/9/3243>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores tumorais, ferritina e telomerase, devem ser utilizados como diagnóstico apenas quando associados a outros exames uma vez que podem fornecer falso-positivos, pois seus níveis podem estar elevados em pacientes não cancerígenos ou falso-negativos em casos de pacientes com presença de neoplasia sem alterações nos níveis dos marcadores associados àquele tipo de câncer. Entretanto, de forma geral, os marcadores tumorais podem auxiliar no acompanhamento do câncer e também ajudar o médico a planejar o tratamento apropriado, dado que em alguns tipos de câncer os níveis dos marcadores tumorais refletem o estágio da doença e/ou o prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1205-1219, 2010.

ALMEIDA, J; PEDROSA, N; LEITE, J; FLEMING, T; CARVALHO, V; CARDOSO, A. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

ARAUJO, J. Principais Marcadores Tumorais utilizados na prática clínica: uma revisão bibliográfica. 2013. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, 2013.

BIOCLIN. Bula: Ferritina. 2012. Disponível em: <http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wpcontent/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUCOES_FERRITINA.pdf> Acesso em: 07 abr. 2017.

BORGES, J. Avaliação da Atividade da Telomerase em células-tronco de pacientes como displasia cortical de Taylor. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia Biomédica) - Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.

BOTCHKINA, G.I.; KIM, R.H.; BOTCHKINA, I.L.; KIRSHENBAUM, A.; FRISCHER, Z.; ADLER, H.L. Noninvasive Detection of Prostate Cancer by Quantitative Analysis of Telomerase Activity. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3243-9, 2005.

DOLES. Bula: Ferritina Turbidimétrica. Imnnoturbidimetria. Disponível em: <<http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/51e8fef91811e02eaf5df693cc8a09d.pdf>> Acesso em: 07 abr. 2017.

GOSWAMI, A; KHULLAR, M; SINGH,K; SURI, A; VIJJAN, V. Serum ferritin in renal cell carcinoma: Effect of tumor size, volume grade, and stage. **Indian Journal of Cancer**, v. 42, n. 4, p. 197-200, 2005.

HESS, J, L; HIGHSMITH, W, E. Detecção da Telomerase nos Fluidos Corporais. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 18-24, 2002.

HOFFBRAND, V. **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 34-47, 2013.

LEMONS, C. Aspectos estruturais e funcionais do complexo telómero/telomerase. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

NAOUM, P. Métodos de Avaliação Laboratorial. 2012. Disponível em:<<http://www.ciencianews.com.br/aulavirt/metodos.pdf>>

SALDANHA, V. Ferritina: intervalos de referência para adultos no Estado do Rio Grande do Norte. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

PARSONS, H, A. Telômeros, Telomerase e Câncer. **Revista Fac. Ciências Médicas Sorocaba**, v. 5, n. 1, p. 54-59, 2003.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. 2011. Disponível em: < <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf> > Acesso em 07 abr. 2017.