

BÁRBARA SOFIA GARRIDO FERREIRA

**PROTEÍNAS INIBIDORAS DE RIBOSSOMAS –
APLICAÇÕES NA TERAPIA DO CANCRO**

ORIENTADOR CIENTÍFICO
Professor Doutor Amilcar Roberto

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2020

BÁRBARA SOFIA GARRIDO FERREIRA

**PROTEÍNAS INIBIDORAS DE RIBOSSOMAS –
APLICAÇÕES NA TERAPIA DO CANCRO**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 22/ 01/ 2021, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 02/2021, de 01/2021 com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof. Doutora Rejane Tavares

Orientador:

Prof. Doutor Amílcar Roberto

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

**Lisboa
2020**

EPÍGRAFE

*Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do
homem foram conquistadas do
que parecia impossível.
(Charles Chaplin)*

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia ao meu pai Aníbal Felício e à minha mãe Antolina Ferreira, que sempre acreditaram nas minhas capacidades, sempre me apoiaram. Sem eles não seria possível nada deste meu percurso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Amílcar Roberto, pelo incansável apoio, pela dedicação, ensinamento e estímulo que me foi sempre transmitindo.

Aos meus pais, Aníbal Manuel Felício Ferreira e Antolina Maria Cabral Sousa Garrido Ferreira, sem eles nada disto teria acontecido. O resultado destes 5 anos é muito deles, por todo o apoio, creditação e empenho.

À minha irmã, Beatriz Ferreira, é a minha essência e a minha metade. Sem a ter na minha vida, nada era concretizável.

A todos os meus amigos, que de forma directa ou indirecta estiveram presentes na minha vida, incentivando-me, apoiando-me e ajudando-me na concretização de mais esta etapa.

RESUMO

As Proteínas Inibidoras de Ribossomas (RIPs) existem em plantas e fungos, atuando como forma de proteção das mesmas contra agentes patogénicos. Estas danificam irreversivelmente os ribossomas das células inibindo consequentemente a síntese proteica.

As RIPs há muito que têm sido investigadas, determinando avanços no conhecimento do seu mecanismo de ação e verificando a sua possível aplicação no âmbito bio-médico. Relativamente às aplicações bio-médicas, encontramos nas RIPs actividade antiviral, antifúngica, imunológica e principalmente anti-cancerígena.

Biologicamente, o cancro é definido como uma proliferação celular anormal. Acima de tudo, o cancro é a doença do século XXI, sendo atualmente uma das principais causas de morte. É inquestionável a necessidade de investigar uma área tao importante como esta, ao nível do tratamento, detecção, prevenção ou “apenas” da forma a melhorar a qualidade de vida dos seus portadores.

As RIPs, sendo enzimas que depurinam o RNA ribossomal (rRNA), inibindo a síntese proteica, potenciam uma esperança para a sua aplicação no cancro, uma vez que podem inibir a proliferação celular através de vários mecanismos.

Palavras Chave: RIPs; Cancro; Efeitos terapêuticos

ABSTRACT

Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) exist in plants and fungi, acting as a way of protecting them against pathogens. They irreversibly damage the ribosomes, inhibiting the protein synthesis.

RIPs have long been researched and advances have been made, especially as far as their mechanism of action works and their potential applications in the bio-medical field are concerned.

Within these, we find antiviral, antifungal, immunological and mainly anti-cancer activity.

Biologically, cancer is defined as an abnormal cell proliferation. Most of all, cancer is the XXI century disease and is currently a leading cause of death. It is, thus, urgent to investigate such deadly disease on its treatment, detection, and prevention levels or "just" to find a way to help improve the quality of life in cancer patients.

RIPs, being enzymes that purify ribosomal RNA (rRNA), inhibiting protein synthesis, increase hope for their use in cancer treatments, since they can inhibit cell proliferation through several mechanisms.

Keywords: RIPs; Cancer; Therapeutic effects

ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRONIMOS E SÍMBOLOS

AA: Aminoácido
AC: Anticorpo
ADP: Difosfato de Adenosina
ATF: Fragmento amino-terminal
ATP: Trifosfato de Adenosina
BFA: Brefeldina A
cADN: ADN complementar
CG: Complexo de Golgi
DNA: Deoxyrribonucleic acid (Ácido Desoxi-Ribonucleíco)
DOX: Doxorubicina
EF: Factor de Alongamento
EPI: Epirubicina
IFN: Interferão
IM: Imunotoxina
kDa: *KiloDalton*
LDL: Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baixa densidade)
mRNA: RNA Mensageiro
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAP: Enzima Fosfatidato Fosfatase
PARP: Ribose de Polimerase Ativada
PCD: Programmed Cell Death (programa de morte celular)
RE: Retículo Endoplasmático
RF: Factor de Terminação
RIPs: Ribosomes Inhibitory Proteins (Proteínas Inibidoras de Ribossomas)
RNA: Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleíco)
rRNA: RNA Ribossomal
SOD: Superóxido Dismutase
TCS: Tricossantina
tRNA: RNA de transporte
5-FU: 5-fluoracilo

ÍNDICE

Introdução

Capítulo I

1.1. Ribossomas, Atividade Enzimática e Síntese Proteica.....	13
1.2. Proteínas Inibidoras de Ribossomas (RIPs): Classificação.....	16
1.3. RIPs e Modo de Ação Celular.....	19
1.4. Estrutura Molecular das RIPs.....	22
1.5. Distribuição na Natureza das RIPs.....	22
1.6. Atividade Enzimática das RIPs.....	24
1.7. RIPs e suas Aplicações.....	26

Capítulo II

2.1. O Cancro.....	28
2.1.1. Fases Carcinogénicas.....	29
2.2. Causas de Cancro e Fatores de Risco.....	30
2.3. Epidemiologia do Cancro.....	31
2.4. Cancro da Mama.....	35
2.5. Diagnóstico.....	39
2.6. Tratamento.....	40

Capítulo III

3.1. A Apoptose.....	42
3.2. RIPs na Oncologia.....	48
3.2.1. Imunotoxicologia/ Conjugados.....	48

Conclusão.....	51
----------------	----

Bibliografia.....	52
-------------------	----

Webgrafia.....	58
----------------	----

Bibliografia de Imagens, Tabelas e Gráficos.....	60
--	----

INTRODUÇÃO

A terminologia “cancro” define-se pelo crescimento descontrolado e propagação de células, que pode afetar qualquer parte do corpo, sejam órgãos ou tecidos (OMS, 2014). Estas células mutadas, frequentemente invadem o tecido circundante e podem originar metástases. Através da prevenção, grande número de cancros podem ser evitados minimizando os fatores de risco, como por exemplo o consumo de tabaco, o consumo excessivo de álcool, o alto índice de massa corporal, a inércia.

O cancro é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos em 2012. Estudos revelam que nas próximas duas décadas, o número de novos casos poderá aumentar cerca de 70%. Afeta toda a população, de forma independentemente do sexo, idade, raça e estatuto social. (OMS, 2020)

Sendo a segunda causa de morte ao nível mundial (estando a sua frente apenas as doenças cardiovasculares), foi responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018, o que prefaz que cerca de 1 em cada 6 mortes tem o vínculo desta patologia. (OMS, 2020)

Segundo as últimas estatísticas, os tipos de cancro com maior taxa de mortalidade são: o cancro do pulmão, com 1761 007 mortes; o cancro colorectal, com cerca de 880 792 mortes; o cancro do estômago, com 782 685 óbitos; o cancro hepático, com 788 000 mortes referenciadas; e o cancro da mama, com 626 679 óbitos. (IARC, 2018)

Um diagnóstico correto é essencial para um tratamento adequado e eficaz, uma vez que cada tipo de cancro requer um regime de tratamento específico que engloba uma ou mais modalidades. Como tratamentos recorrentes para este tipo de patologia, existem: a intervenção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia.

Os estudos relativos ao cancro têm acompanhado um aumento significativo devido à sua emergência, por forma a que seja encontrado um tratamento eficaz e com efeitos adversos minimizados. É neste contexto que entram as Proteínas Inibidoras de Ribossomas (RIPs), que genericamente são enzimas com rRNA depurinado (RNA que enfrentou uma reação química, em que a ligação β -N-Glicotídica é clivada hidroliticamente, libertando uma base nucleica de purina – Adenina ou Guanina) e que, por sua vez inibem a síntese proteica das células cancerígenas. Existem RIPs que são potentes recursos bio-médicos, pois causam lesões apoptóticas e induzem a necrose das células, sendo assim importantes meios na luta contra o cancro, como é o caso da Ricina. (F. Stirpe & Battelli, 2006)

As RIPs têm diferentes aplicações bio-médicas. Entre as quais se destacam não só as atividades de inibição de tradução e atividades RNA N-glicosilases, mas também a atividade anti-mitogénica, imunomoduladora, anti-proliferativa e imunossupressora (na resposta humoral, que é mediada por anticorpos, e na resposta mediada por células, levando a que a sua administração previna a formação de anticorpos e retarde a rejeição da transplantação). (SPREAFICO et al., 1983; DESCOTES et al., 1985; BENIGNI et al., 1995) e (MATOS, Djamile; 2008). Para além destas, vários estudos demonstraram também que as RIPs têm efeitos antifúngicos, anti-inflamatórios e anti-alérgicos e ainda aplicações ao nível da investigação direcionada para a agricultura. (F. Stirpe & Battelli, 2006)

Ao longo da última década, as RIPs têm sido amplamente investigadas na terapia do cancro com resultados muito significativos. Algumas destas, exibem uma elevada toxicidade em células cancerígenas enquanto nas células normais demonstram baixa toxicidade. Deste modo atuam impedindo ou inibindo o crescimento tumoral, principalmente pela via apóptotica (o mecanismo específico das RIPs ainda não é conhecido). (Zeng et al., 2015)

Esta dissertação pretende rever os vários estudos das aplicações terapêuticas das RIPs, dando principal ênfase às suas atividades anti-cancerígenas.

CAPÍTULO I

1.1. Ribossomas, Atividade Enzimática e Síntese Proteica

Na década de 1950, o biólogo George Palade identificou nas superfícies da membrana do Retículo Endoplasmático, pequenos grânulos que constituíam o local de síntese proteica; em 1958 estes foram designados por Ribossomas.(Roberts, R.B.1958)

Ribossomas são estruturas que se encontram localizadas no citoplasma das células eucariotas e procariotas, em forma livre ou associados ao Complexo de Golgi. Os ribossomas são constituídos por duas subunidades: a grande e a pequena, cada uma contém vários rRNA e proteínas. Enquanto a leitura dos codões no mRNA decorre na subunidade pequena, a formação das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos de uma proteína decorre na subunidade grande. A sua principal função é a síntese de proteínas, processo este que decorre essencialmente na etapa da tradução (RNA, enzimas específicas, ribossomas, etc), contudo outro processo imprescindível para a síntese proteica é a transcrição (ADN) que antecede a mesma. Em suma, o ADN é transcrito pelo RNA mensageiro (mRNA), posteriormente esta informação é traduzida pelos ribossomas (complexo rRNA-proteínas) e pelo RNA transportador (tRNA) que transportará os aminoácidos (AA) que irão dar origem à proteína.

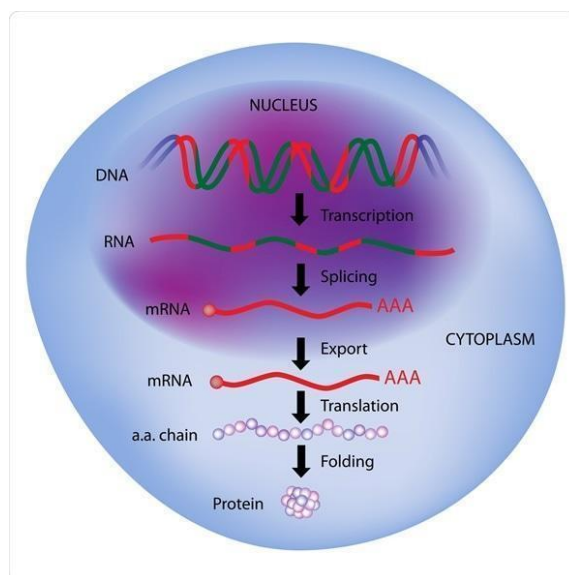


Ilustração 1 - Esquema da síntese proteica.

<http://www.news-medical.net/life-sciences/Regulation-of-Gene-Expression.aspx>

A síntese das proteínas (esquematizado na ilustração nº1 e nº2), significa portanto, a tradução da mensagem genética, inicialmente transcrita num mRNA, para uma cadeia peptídica. Esta montagem dos aminoácidos (AA) ocorre no citosol e posteriormente nos ribossomas; estes são entregues ao mRNA (as duas subunidades do ribossoma associam-se a uma molécula de mRNA) através de diferentes moléculas de RNA de transferência (tRNA). Cada tRNA liga-se a um AA específico. (Genuth, N.R. & Barna, M. 2018)

Outros investigadores, (Lullman, Heinz et al. 2016) determinam que a síntese proteica envolve as seguintes etapas:

- Transcrição: a informação codificada no DNA é copiada para uma molécula de RNA. A molécula de RNA é enviada para o citoplasma de modo a reunir todos os componentes necessários para a síntese de proteínas (aminoácidos, RNAs de transporte, ribossomas, etc).

- Ativação dos AA: ocorre pela ação de enzimas específicas que se unem ao tRNA, formando o complexo AA-tRNA, originando ao anticódon (uma sequência de 3 bases complementares ao códon de mRNA). Para que esse processo aconteça, é necessário a existência de energia, que é fornecida pelo ATP (trifosfato de Adenosina). (Ophardt, Charles. 2003)

- Tradução: A mensagem contida no mRNA é decodificada no ribossoma. A tradução subdivide-se em três fases. 1) A Iniciação que ocorre no citoplasma: o mRNA interage com a subunidade do ribossoma, desencadeando a abordagem do tRNA que transporta os AA dispersos no citoplasma até aos ribossomas. O primeiro tRNA liga-se ao códon de iniciação (é o mesmo para todas as proteínas); à medida que a estrutura completa do ribossoma é formada, outra molécula de tRNA aproxima-se. 2) A Elongação: um segundo tRNA transporta um AA específico com o códon; este estabelece uma ligação peptídica entre o AA recém-chegado e a metionina. O ribossoma avança três bases ao longo do mRNA (movimento do ribossoma e relação ao mRNA para decodificar o códon seguinte), repetindo-se sempre o mesmo processo. Os tRNA que já se ligaram inicialmente, vão-se libertando sucessivamente do mRNA. 3) A Terminação: O ribossoma encontra o códon de finalização (UAA, UAG ou UGA – códones que não codificam AA) terminando assim o alongamento. Quando os factores de terminação (proteínas RF) ligam-se ao ribossoma, provoca uma reação química que faz com que a cadeia peptídica se dissocie do tRNA e se liberte do ribossoma, consequentemente o ribossoma liberta o mRNA e as subunidades deste separam-se, podendo ser recicladas e por fim, a proteína é libertada. (Quintas, Alexandre et. al.; 2008)

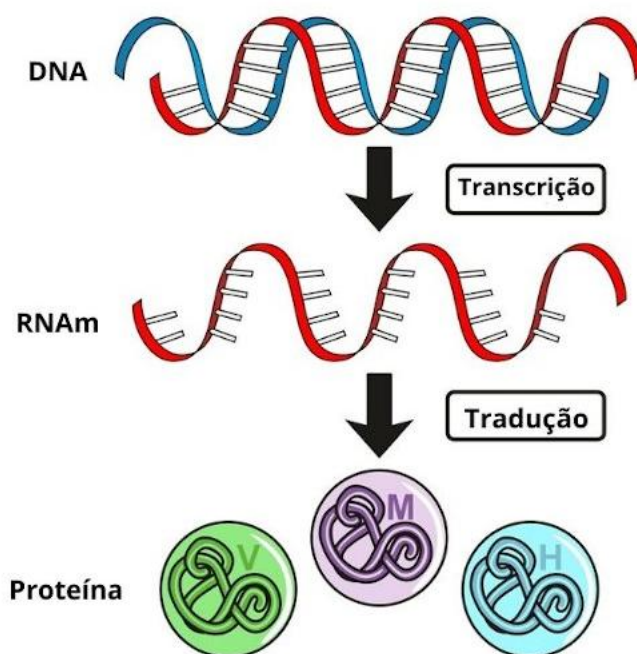


Ilustração 2: O processo de síntese proteica: informação contida no DNA é transcrita para o mRNA e, seguidamente, traduzida numa sequência de aminoácidos, formando a proteína.

<https://www.biologianet.com/biologia-celular/sintese-proteica.htm>

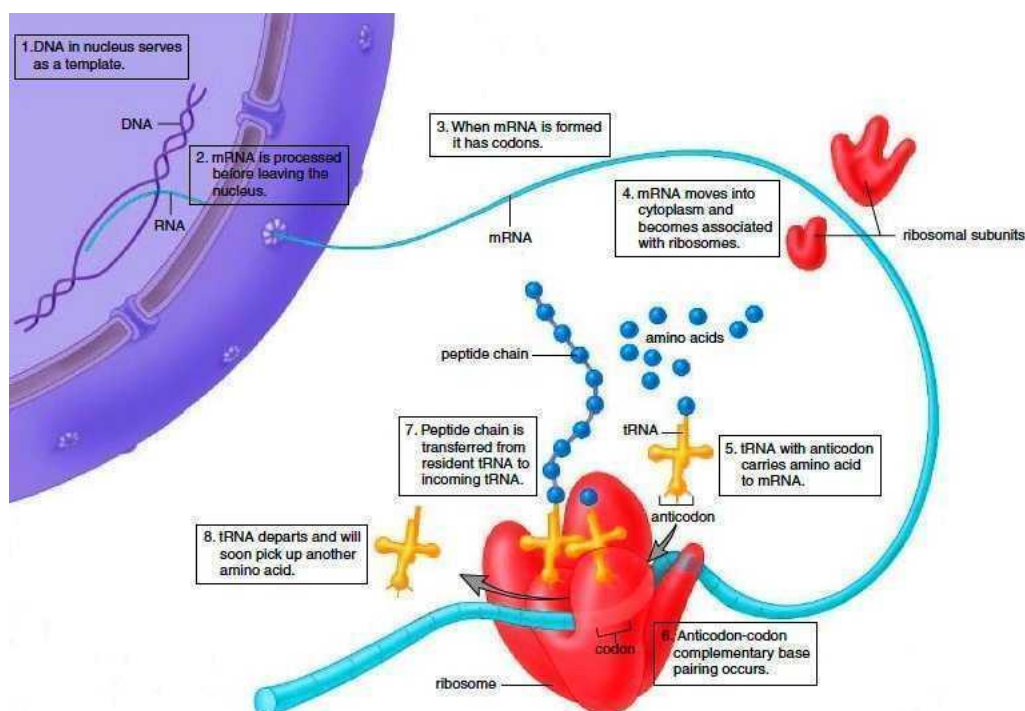


Ilustração 3: Esquema da síntese Proteica

(Kuchelet et al, 2011. "Schaum's outline of biochemistry" 3ª Edição)

1.2. Proteínas Inibidoras de Ribossomas (RIPs): Classificação

Por necessidade, desde os tempos mais remotos, que o Homem foi utilizando plantas com capacidades curativas para fins medicinais, encontrando por vezes algumas com constituintes tóxicos. Estes constituintes podem ser identificados em plantas, fungos, algas e bactérias. (Bolognesi et al., 2016)

A história das RIPs começou quando a comunidade científica se interessou na toxicidade do “veneno” das plantas. (Bolognesi et al., 2016). Mais recentemente, foram descritos RIPs fúngicos e bacterianos, tendo sido igualmente encontrada actividade adenina glicosidase nos tecidos animais. (Stripe, F., 2004)

Paul Ehrlich encontrou e posteriormente utilizou como anticorpos duas potentes toxinas: a Ricina (sementes de *Ricinus communis*) e a Abrina (sementes de *Abrus precatorius*) atualmente identificadas como RIPs.

Estas são compostas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia enzimática A (danifica os ribossomas) e uma cadeia de lectina B (específica de galactose). (F. Stirpe & Battelli, 2006)

As RIPs são portadoras deste mesmo nome justamente por inibirem os ribossomas catalítica e enzimaticamente, e consequentemente inibirem a síntese proteica.

As RIPs são uma família de enzimas com actividade de N-glicosidase que provoca a libertação de uma adenina específica da subunidade ribossómica 60S no ciclo sarcina-ricina, uma sequência altamente conservada localizada na grande subunidade ribossómica no RNA. Esta actividade impede a formação de uma configuração crítica do ciclo estaminal, à qual se sabe que o factor de alongamento (EF) se liga durante a fase de translocação da tradução e, como tal, impede a continuação da tradução. (Reyes, Ana G et al, 2013)

Para facilitar a definição, estas enzimas são classificadas segundo dois grandes grupos:

a) RIPs Tipo I são enzimas monoméricas que contêm apenas uma única cadeia polipeptídica (A), fortemente básica, com atividade enzimática e massa molecular de aproximada de 30 kDa (Fabrinni et al, 2017). Com um domínio RNA N-glicosilase, estas RIPs não possuem uma cadeia ligante a glicoconjugados e apresentam baixa citotoxicidade, podendo algumas delas entrar na célula através do mecanismo de endocitose fase-fluida. (Akkouh et al., 2015)

b) RIPs Tipo II são enzimas diméricas, constituídas por duas cadeias polipeptídicas distintas (AB): uma com atividade enzimática aproximadamente de 30 kDa e outra com valores próximos dos 35 kDa. A cadeia A é responsável pela

exposição da atividade tóxica na N-glicosidase; é a porção com atividade enzimática que permite remover um resíduo de adenina de um loop exposto da sub-unidade 28S do rRNA, inibindo assim a síntese protéica (Olsnes, 2004). Enquanto a cadeia B é constituída por Lectina, pode ligar-se a glicoproteínas ou glicoconjugados presentes na superfície celular (Steeves et al., 1999), mediando o transporte da cadeia A para o citosol (interior da célula), onde terá acesso aos ribossomas (Akkouh et al., 2015) Exemplos: Abrina, Ricina e Pulchelina. As RIPs Tipo II são constituídas por proteínas tóxicas e não tóxicas, e apesar das não tóxicas possuírem menor actividade, estas muitas vezes são conjugadas com outras proteínas de modo a serem utilizadas como target para algumas patologias, como cancro. (Citores et al. 2002)

Foi descrito ainda um terceiro grupo de RIPs, sendo RIPs tipo III (Pneumans et al., 2001), por exemplo a *Cucurbitaceae* (cânfora). (Jack Ho Wong et al, 2019) Estas proteínas são sintetizadas como precursores inativos (ProRIPs) que requerem processos proteolíticos para formar uma RIP ativa, ou seja, são constituídas por uma única cadeia com um segmento adicional de uma proteína, segmento este que terá de ser removido para que a RIP se torne ativa. Este tipo de RIP compreende um domínio terminal-amina que se assemelha a uma RIP tipo I ligada a um domínio terminal-carboxil (domínio C terminal) com uma função ainda desconhecida. (De Virgilio, M. et al. 2010).

As Proteínas Inibidoras de Ribossomas (RIPs) pertencem a uma classe de moléculas tóxicas. Através da produção de citoquinas, as RIPs provocam processo inflamatório com objetivo destruir as células, devido a uma reação enzimática específica (lesões e necrose). (Pizzo & Di Maro, 2016)

As RIPs são enzimas que atuam danificando os ribossomas de uma forma irreversível. Atuam através da ligação à subunidade 60S ribossómica na qual atuam como uma N- β -glicosidase do rRNA, levando à clivagem específica de um ou mais resíduos de adenina na subunidade 28S do rRNA (Pneumans et al., 2001; De Virgilio, 2010). A clivagem desta ligação simples interfere assim com a ligação entre os fatores de alongação e os ribossomas, promovendo deste modo a inibição da síntese de proteínas. (Zeng et al., 2015)

Geralmente, as RIPs II são altamente tóxicos. A elevada toxicidade dos RIPs II pode, na sua maioria, ser explicada pela componente da cadeia B que, devido às suas propriedades Lectínicas, permite a ligação da superfície celular e a subsequente entrada da cadeia A na célula, onde exerce a sua actividade sobre os ribossomas. (Reis, Ana et al 2012). As RIP de tipo I, desprovidas de Lectina da cadeia B (que facilita a entrada e explica a toxicidade extrema das RIP tipo II), entram no citoplasma através de um

percurso independente do Complexo de Golgi (CG), tornando assim, a sua absorção pelas células mais difícil. Por esta razão são menos tóxicos do que os RIPs do tipo II, mas podem tornar-se altamente tóxicas se forem introduzidos em células por ligação a um transportador apropriado que seja capaz de se ligar às células. Ou seja, a falta da cadeia de Lectina (B) limita significativamente o acesso das RIPs tipo 1 ao interior das células determinando consequentemente a baixa de citotoxicidade, e por consequente, as RIPs tipo II como conseguem o reconhecimento mediado pela cadeia A das porções de galactose na superfície das células dos mamíferos, o seu grau de toxicidade torna-se mais elevado. (Zeng et al., 2015)

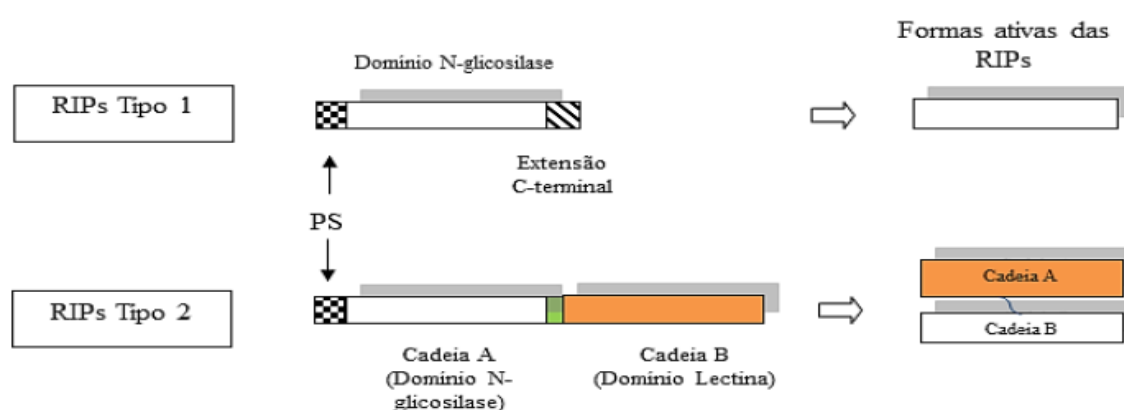


Ilustração 4- Classificação das RIPs, ambas contêm a sequência N-terminal de 25 resíduos que será eliminada durante o processo pós-traducional; adicionalmente o tipo 2 contém uma série de 12 resíduos que se denomina por "linker" (verde) que também é, posteriormente eliminado. A laranja encontra-se a cadeia de Lectina. Fonte: (NIELSEN, BOSTON, 2001)

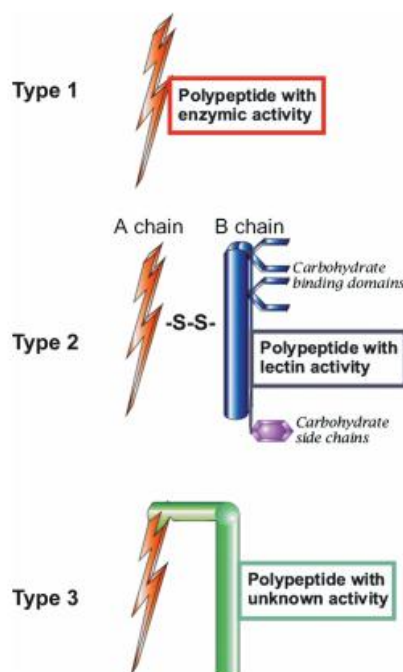


Ilustração 5 – Esquema da estrutura dos três tipos de RIPs (Stirpe, 2004)

1.3. RIPs e modo de ação celular

O primeiro grande passo para a acção das RIPs é a sua ativação. Para tal, muitas destas RIPs sofre vários mecanismos como clivagem de peptídeos internos dos domínios N-glicosidase através de proteases. (De Zaeytjdt et al., 2017).

Nas RIPs II, o primeiro grande processo de ativação destas, é a clivagem redutiva da cadeia A.

Vários estudos foram colocando em evidência a estreita correlação entre as RIPs citotóxicas e o seu transporte intracelular que pode alterar-se entre os diferentes tipos de células. Estas alterações podem depender de três fatores (Pizzo & Di Maro, 2016):

- i) A expressão dos diferentes tipos de moléculas de ligação (ligantes) à superfície das células;
- ii) A triagem dos complexos das RIP-ligantes aos diferentes compartimentos celulares;
- iii) A disponibilidade das diferentes vias de transporte da toxina para o compartimento do citosol.

Todo este processo, comprovado também pela existência das RIPs “não tóxicas”, identificadas em algumas plantas, como referido anteriormente. (Zeng et al., 2015) Estas RIPs não tóxicas são bastante importantes para o processo de sobrevivência das plantas (devido às suas reações enzimáticas) mas com pouca (ou ainda não conhecida) importância na utilização terapêutica).

As RIPs penetram na célula através da ligação aos receptores de superfície da membrana celular, depois atravessam a parede celular por um processo de endocitose e quando finalmente chegam ao citosol pela via de translocação através de compartimentos endocíticos intracelulares. Isto ocorre após a realização do transporte retrógrado (movimento de moléculas e organelos para o interior do corpo celular, do Complexo de Golgi (CG) para o retículo endoplasmático (RE)). No RE, as porções catalíticas exploram a via de degradação associada ao ER (ERAD) de forma a atingir os seus alvos citosólicos. A via endocítica é um processo no qual as moléculas são absorvidas pela membrana celular (transporte de substâncias extra-celular para intra-celular) envolve a invaginação da superfície da célula que leva a formação de vacúolos endossómicos. Este mecanismo compreende endossomas (iniciais ou tardios) e lisossomas.

A interação célula –RIP demonstra características comuns, tais como:

- a) Apenas algumas toxinas absorvidas pelas células são transferidas para o citosol, atingindo o seu alvo;
- b) A deteção da inibição proteica só consegue ser detetada cerca de pelo menos 30 minutos após a ocorrência;
- c) Apenas uma RIP pode ser responsável pela morte celular.

Um estudo (De Virgilio, M. et al., 2010) colocou em evidência que a Gelonina, quando conjugada com a Concanavalina A, demonstra maior toxicidade para as células do que a Gelonina livre. Os movimentos intracelulares de Saporina (RIP produzida pela *Saponaria officinalis*) dependem do transporte axonal anterógrado (movimento de moléculas e organelos proveniente da membrana plasmática para o interior do corpo celular) para chegar ao seu alvo. A ligação à superfície celular desta RIP é mediada por membros receptores relacionados com lípidos de baixa densidade (LDL), que mostraram uma diminuição (cerca de menos dez vezes) na sensibilidade à Saporina e mediaram a internalização do fragmento amino-terminal (ATF) - Saporina através de cavidades revestidas com clatrina.

A Tricossantina (TCS, outra RIP do tipo I) interage com fosfolípidos da camada da membrana celular, carregada negativamente, em condições ácidas, através de interações hidrofóbicas. Segundo Fang, E.F. et al., (2011) este microambiente ácido da

membrana celular, altera as cargas em alguns resíduos, resultando numa quebra de pontes salinas e numa repulsão carga-carga, que desnatura parcialmente TCS para um "estado globular dissolvido" levando, finalmente, à sua inserção na membrana.

Conclui-se portanto que o CG não é um compartimento intracelular principal para o transporte de Saporina em comparação com células Vero ou células tratadas com Brefeldina A (BFA - um antiviral de lactona produzido por *Eupenicillium brefeldianum*, que inibe o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi de forma indireta), pois a sua toxicidade não é afetada pelo tratamento com BFA ou cloroquina, indicando que a Saporina segue uma via independente do CG para o citosol e requer um pH baixo para a translocação da membrana (Vago et al., 2005).

Em contrapartida, RIPs de tipo II, após atravessarem as membranas da mesma forma, ligam-se às unidades de galactose e são transportadas do CG para o RE, sendo o inverso do transporte vesicular (transporte do RE para o CG). Já no lúmen do RE, as cadeias A e B são dissociadas e finalmente a porção da cadeia A é transportada para o citoplasma.

Como as RIPs tipo II não conseguem penetrar diretamente a membrana celular, ligam-se a vários componentes da superfície celular entrando então através de um processo que se denomina por endocitose. A endocitose mediada por receptores ocorre através de cavidades revestidas por clatrina (proteína que tem por função aumentar a eficiência da endocitose). Mas antes de qualquer mecanismo, a primeira grande fase de interação célula-RIP consiste na ligação da RIP aos locais de receptores da membrana através de resíduos de galactose ligados por ligações β -1,4 (ligações glicosídicas presentes em glicoproteínas de mamíferos e glicolipídicos). Outros autores (Giansanti L. et al 2010) concluíram que a cadeia A e B da Ricina são também constituídas por grupos oligossacarídeos (contêm o hidrato de carbono denominado por Manose) que são responsáveis pela absorção e toxicidade da toxina em células de fígado de ratos. Contudo Roberts, L.M. et al., (2004) refere que a captação da Ricina por estas células é completamente nula, demonstrando mais tarde que a ligação da Lanceolina às células com moléculas glicolisadas na membrana celular estava relacionada sim com a cadeia B (Battelli et al., 2010). Concluindo então que a galactose inibe a ligação das RIPs devido à interação que tem com a Lectina. A Ricina depois de penetrar na célula é entregue aos endossomas iniciais, onde é reciclada e regressa à superfície celular ou entregue (pelos endossomas tardios) aos lisossomas e é degradada proteoliticamente. Segundo Sandving, K. et al (2010), a resistência à Ricina é observada quando o transporte do endossoma para o CG é bloqueado pela diminuição de temperatura. Esta liga-se a uma variedade de moléculas de superfície diferentes e segue várias vias intracelulares, uma

ou mais das quais permitem que a toxina seja transferida para o citosol (Puri, Kaur, Perugini, & Gupta, 2012). O transporte anterógrado de Ricina do CG para ER envolve o movimento através de vesículas revestidas com proteínas (COP-I) (Bonifacino & Rojas, 2006).

1.4. Estrutura Molecular das RIPs

Como anteriormente referido, as RIPs são classificadas em dois grupos distintos: RIPs Tipo I (cadeia A) e RIPs Tipo II (cadeia A B). Estas distinguem-se pela presença ou ausência de uma cadeia polipeptídica que contém locús de interação com carboidratos.– Lectina.

A cadeia B está diretamente envolvida no processo de adesão e permeabilização da célula, enquanto a cadeia A está intimamente relacionada com a inativação dos ribossomas através de atividade enzimática.

1.5. Distribuição na Natureza

A grande maioria das RIPs podem ser encontradas nas plantas (principalmente em *Angiopermae*), sendo as do tipo I observadas nos vários estudos realizados, em quantidades muito superiores às do tipo II. (Lam & Ng, 2001; Yao et al. 1998).

Vários estudos fornecem listas dos diferentes tipos de RIPs encontradas. Atualmente a listagem de RIPs tipo II que têm surgido estão relacionadas proporcionalmente ao número de estudos, podendo ser confirmado na tabela nº1.

Toxin	Source	Toxicity	
		to HeLa cells IC ₅₀ ^a (M)	to mice LD ₅₀ ^b (µg/kg)
Abrin	<i>Abrus precatorius</i> seeds	3.9×10^{-12} [20]	2.8 [9]
Ricin	<i>Ricinus communis</i> seeds	6×10^{-13} [21]	8 [8]
Mistletoe lectin I	<i>Viscum album</i> leaves	1.7×10^{-9} [20]	2.4 [22]
Modeccin	<i>Adenia digitata</i> root	2.8×10^{-12} [20]	5.3 [23]
Volkensin	<i>Adenia volkensii</i> root	3×10^{-13} [24]	1.7 [24]
RIP	<i>Adenia goetzii</i> caudex	1×10^{-12} [25]	
Lanceolin	<i>Adenia lanceolata</i> caudex	5×10^{-13} [25]	6.8 ^c
Stenodactylin	<i>Adenia stenodactyla</i> caudex	3×10^{-13} [25]	< 1.2 ^c
Aralin	<i>Aralia elata</i> shoots	1.3×10^{-12} ^d [26]	
Riproximin	<i>Ximenia americana</i> powder [27]	1.1×10^{-12} ^e	

^a Concentration causing 50% inhibition of protein synthesis.

^b Dose killing 50% of the animals within 7 days.

^c Unpublished results from our laboratory.

^d Dose killing 50% of the cells.

^e Personal communication from C. Voss.

Tabela nº1: Listagem atualizada das RIPs Tipo II (Stirpe, F.; Battelli, M.G. (2016), Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. Cell. Mol. Life Sci.)

Segundo F. Stirpe e M.G. Battelli (2016), uma das RIPs tipo II mais conhecida é a Aralina. Esta foi descoberta nos rebentos de *Aralia elata*, sendo descrita como comestível, uma vez que a RIP é destruída pelas altas temperaturas (cozedura) independentemente das suas concentrações também não serem nocivas por via oral (0,32mg/100g). Assim sendo, eventualmente existirão outras RIPs de tipo II presentes noutras plantas, que ainda não foram encontradas devido ao baixo nível de toxicidade/ inexistência de efeitos.

Foi descoberta outra proteína tóxica na planta *Ximenia americana*, que parece tratar-se de uma nova RIP. Pelosi, E., Lubelli et al., (2005), refere que foram encontradas em três Passifloraceae (*Adenia goetzii*, *Adenia lanceolata* e *Adenia stenodactyla*) outras RIPs tipo II altamente tóxicas. Contudo a descoberta destas toxinas não foi inovadora, já que duas RIPs tipo II (Modeccina e Volkensina) tinham sido descobertas na *Adenia* (*Modecca*) *Digitata* e *Adenia Volkensii*, respectivamente. Deste modo, parece plausível afirmar que as RIPs tipo II são singularmente frequentes entre as plantas do género *Adenia*, muitas das quais (todas as examinadas) contêm lectinas ligadas a galactose .

As RIPs podem estar presentes num ou mais tecidos de uma planta e por vezes apresentarem mais que uma forma. Podem ser encontrados em sementes, raízes, caules, folhas, flores, frutos ou até mesmo nas células cultivadas (Stirpe, F. 2004). Vários estudos referem que a Ricina está presente apenas nas sementes de plantas de *Ricinus* enquanto diferentes formas de Saporina foram encontrados em tecidos como folhas, raízes e sementes da *Saponarina officinalis* (Ferrerias, J. M, et al. 1993)

Frequentemente podem ser encontradas tanto as RIPs de tipo I como as tipo II na mesma planta, podendo ser produzidas também por caules e células vegetais em cultura. (F. Stirpe & Battelli, 2006)

Em plantas, a expressão das RIPs é aumentada durante o processo de senescência (processo de envelhecimento natural das células em que estas deixam de se dividir e metabolizar) e em várias condições desfavoráveis, como o stresse (Rippmann, J. et al. 1997), as infeções virais e contaminações por microorganismos

As RIPs também estão presentes em bactérias, apesar de em número limitado, como por exemplo *E. coli*, *Shigella disenteria* e *Streptomyces coelicolor* (Reyes, Ana et al, 2012). As toxinas Shiga (produzida pela *S. disenteria*) e Shiga-like (SLT) (produzida pela *E. coli*) são as RIPs bacterianas mais bem estudados.

As toxinas Shiga são RIPs do tipo II, portanto constituídas por uma cadeia A com actividade N-glicosidase e uma cadeia B com Lectina, como podemos verificar na ilustração nº6. O fragmento A (32 kDa) é constituído por duas subunidades (A1 e A2) ligadas por um dissulfureto e é responsável pela inibição da síntese de proteínas através da remoção de um adenina da subunidade principal do ribossoma. O fragmento B é

constituído por cinco subunidades idênticas de 7,7 kDa. As suas toxinas são classificadas em dois tipos principais, Stx1 e Shiga toxina 2, ambas com estruturas semelhantes mas com diferentes sequências da cadeia A.

Estas toxinas são responsáveis por importantes doenças como a anemia hemolítica microangiopática, insuficiência renal e, em alguns casos, sintomas neurológicos (Pneumans, WJ. et al., 2010). Para exercer a sua actividade, as toxinas Shiga ligam-se primeiro com a ajuda do fragmento B ao receptor Gb3 do glicolípídeo na superfície da célula, sendo posteriormente transportados por endocitose e, subsequentemente, a cadeia A entra no citosol onde exerce a sua actividade enzimática, conduzindo à inibição da biossíntese de proteínas e a morte celular. (Felines, PO et al., 2000).

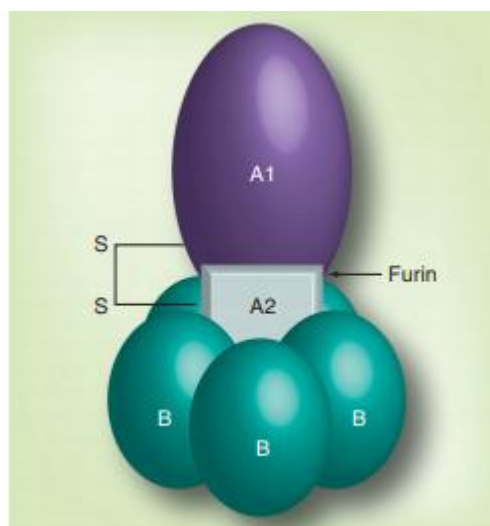


Ilustração 6: Representação da estrutura da RIP Shiga. Reyes, Ana et al, (2012).

1.6. Atividade Enzimática das RIPs

O tratamento de ribossomas eucariotas com RIPs (como por exemplo com Analina) demonstra a sensibilização da subunidade 28S do RNA destes mesmos ribossomas, resultando na quebra de ligação N-Glicosidica e na produção de um fragmento de RNA com 450 nucleotídeos (denominado por “Endo’s Band”). (Jack Ho Wong et al., 2019)

Os primeiros estudos bioquímicos sobre a Ricina (Montanaro, L., et al., 1973), demonstraram que a toxina inibe a síntese proteica em células e concluíram que os ribossomas eram o seu alvo, uma vez que estes não se conseguiam ligar ao fator de

alongamento (EF-Tu em procariotas e eEF-1 α em eucariotas). Mais tarde, (Endo & Tsurugi, 1988) descobriu-se que a atividade de N-glicosidase da toxina consiste na clivagem de um único resíduo de adenina (A4324 no rRNA de fígado de rato), num ciclo universalmente conservado no topo de um caule em 28S rRNA, resíduo adjacente ao local de clivagem do rRNA num tetranucleotido GA4324GA (ciclo α -sarcina/ricina). A pesquisa foi estendida a todas as RIPs, com atividade semelhante e oficialmente classificadas como r-RNA N-glicosidases.

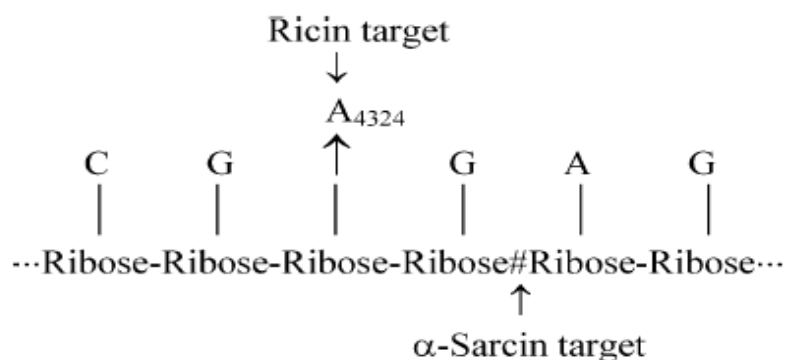


Ilustração 7: Representação esquemática da ação enzimática das RIPs no rRNA para o local de ataque da α -sarcina. Stirpe, F. (2004): Ribosome-inactivating proteins.

As RIPs chegam até aos ribossomas por ligação a proteínas ribossômicas, como é o caso da Saporina a uma proteína não identificada de 30 kDa .

Existem diferenças entre as várias RIPs na sua ação sobre os ribossomas. Assim, algumas, são ativas somente na presença de ATP e cofatores enzimáticos. Tanto o ATP como os cofatores atuam sobre os ribossomas e não sobre as RIPs. Vários destes cofatores foram identificados como tRNAs, diferentes consoante o tipo das RIPs. Subsequentemente, verificou-se que as RIPs removem a adenina de vários polinucleótidos distintos do rRNA e esta capacidade das RIPs (remover resíduos de adenina de diferentes tipos de substratos) que levou à designação de Adenina polinucleotídeo glicosilase (Barbieri, Valbonesi, Gorini, Pession, & Stirpe, 1997).

Através do estudo da enzima Fosfatidato Fostase (PAP) e Ricina, a modalidade de ação das RIPs tornou-se compreensível. Sugerindo que o PAP danifica o ribossoma num local onde ambos os EF se ligam, inibindo a etapa de alongamento da síntese proteica.(Reyes, Ana et al, 2012)

Mais recentemente, foi proposto que o domínio terminal C das proteínas do caule dos ribossomas possa ligar uma cadeia A de Ricina em vez de ligar a eEF-2, entregando assim a cadeia A da Ricina ao alfa-sarcina-ricina através da sua região flexível. (Reyes , Ana et al., 2012)

Para além das actividades de glicosilase das RIPs sobre o RNA, foi também demonstrada atividade quitinase, atividade fosfatase nos lípidos e atividade fosfatase nos nucleótidos para cada RIP. (Reyes, Ana et al., 2012).

Recentemente, Barbieiri, L. refere que as RIPs removem a adenina da cadeia ADP-ribose de polimerase ativada (PARP) que está envolvida no mecanismo de reparação do DNA. Esta alteração da PARP ativada pode ter um papel relevante na inibição da reparação do DNA por RIPs, o que, eventualmente, será independente da inibição da síntese protéica. Na totalidade, essas alterações podem estar envolvidas na atividade transformadora das RIPs que também tem sido observada.

Um estudo demonstrou que, tanto a Shiga (Stx-1 ou Stx-2) (bactéria *Shigella*) como a Ricina têm causado danos iniciais nas células endoteliais do DNA nuclear; concomitantemente com (Ricina) ou após a inibição da síntese de proteínas (Stx-1/Stx-2) e bem antes do início da apoptose. Estes resultados indicaram a ocorrência de um dano direto precoce no DNA, independente da inibição da síntese protéica, e sugerindo que essas toxinas podem entrar no núcleo. (Brigotti et al., 2002)

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) das RIPs tem sido bastante interessante e relevante a comunidade científica. A superóxido é uma das principais espécies reativas de oxigénio na célula e a SOD tem um papel fundamental como antioxidante. A importância fisiológica da SOD é ilustrada pelas severas patologias que se evidenciam em ratos geneticamente modificados para que careçam desta enzima. Os ratos sem SOD2 morrem depois de poucos dias após nascerem por stresse oxidativo. Os ratos sem SOD1 desenvolvem uma grande variedade de patologias, incluindo hepatocarcinoma. Algumas RIPs do tipo 1 como por exemplo a Camphorina e Porrectina (*C. camphora*, *C. porrectum*), foram analisadas em diferentes estudos, como tendo atividade de SOD num nível que evidenciava excluir a possibilidade de contaminação. A SOD purificada também foi referida como tendo atividade de RIP, conduzindo assim à hipótese de que as duas proteínas (*C. camphora*, *C. porrectum*) tinham atividade enzimática dupla. (F. Stirpe & Battelli, 2006).

1.7. RIPs e as suas Aplicações

As RIPs têm vindo a despertar um grande interesse nas mais diversas áreas. Na área da saúde e biotecnologia, todas as RIPs tipo I em que foi testada a sua atividade antiviral obtiveram resultados positivos, tanto em vírus de plantas, como de fungos e animais (F. Stirpe & Battelli, 2006). Relativamente aos efeitos das RIPs nos vírus das

plantas, o primeiro a ser conhecido, levou à transfecção (processo de introdução intencional de ácidos nucleicos nas células) de plantas com genes das RIPs, com o objetivo de aumentar a sua resistência a infecções virais. De facto, verificou-se uma determinada protecção acrescida a alguns vírus nas plantas transfectadas, este facto assenta essencialmente quando se utilizou RIPs de tipo I (Parikh, B.A & Tumer, N.E. 2004).

Em relação às RIPs nos vírus dos animais são estudadas com a mesma ou até maior exaustividade particularmente ao nível da enzima Fosfatidato Fostase (PAP) e Tricossantina, em células infetadas com HIV. A replicação do HIV nas células foi inibida por várias RIPs (Parikh, B.A & Tumer, N.E. 2004), apostando-se em investigações de modo a observar-se se as RIPs pudessem vir a ser utilizados na terapia da SIDA (Shaw, Lee, & Wong, 2005). Infelizmente, além do obstáculo da resposta imune contra estas proteínas estranhas, os poucos ensaios clínicos feitos com Tricossantina deram resultados decepcionantes, e às vezes a proteína administrada agravou os sintomas neurológicos e causou reacções alérgicas. (Parikh, B.A & Tumer, N.E. 2004)

As imunotoxinas são agentes concebidos para atingir e eliminar células cancerígenas, são um anticorpo que está ligado à fracção catalítica de uma toxina bacteriana funcionam como alvos-tumorais. As toxinas-alvo induzem a apoptose ao atingir a citosol e a inactivação de processos celulares vitais ou modificando a membrana superficial das células tumorais. (Instituto de Oncologia, 2017)

Foram estudadas várias RIPs, tais como a Ricina, a Saporina e Gelonina, para utilização antitumoral, conseguindo frequentemente resultados promissores. (Polito, L et al., 2011). Um estudo analisou as moléculas ligadas à subunidade A da Shiga e demonstrou que o STx-1 codifica todas as funções necessárias para o próprio encaminhamento de organelos celulares a fim de alcançar e inativar os ribossomas presentes no citoplasma de células eucarióticas. Este evento conduz posteriormente à apoptose. (Reyes, Ana et al., 2012). Relativamente à subunidade B da RIP Shiga, esta proteína apresenta uma ligação exclusiva ao receptor celular glicolípideo Gb3 com um padrão de expressão marcadamente restrito que visa especificamente determinados tipos de células, como as células que apresentam antígenos (exploração para imunoterapia) ou células tumorais. (Chuang MC et al., 2010)

CAPÍTULO II

2.1. O cancro

As células que constituem os animais são formadas por três partes: a membrana celular (externa); o citoplasma (o corpo da célula); e o núcleo (onde se encontram os cromossomas/genes). Toda a informação genética encontra-se inscrita nos genes, numa "memória química" - o ácido desoxirribonucleico (DNA). Os genes são segmentos da molécula de DNA, responsáveis pelas características herdadas geneticamente. Cada gene é composto uma por sequência específica de DNA que codifica uma proteína para determinada função. É através do DNA que os cromossomas passam as informações que visam o funcionamento da célula.

O desenvolvimento das células ocorre de forma normal, ou seja crescem, envelhecem, morrem e são substituídas por novas. Este processo de desenvolvimento celular é que permite que a integridade dos órgãos se mantenha. A divisão normal das células dá-se através da “célula mãe”, originando as “células filhas” que irão partilhar características semelhantes – o processo de divisão das células é conseguido através de mecanismos de controlo. Quando estes mecanismos não estão a funcionar adequadamente dão origem a uma divisão descontrolada das células, emergindo, deste modo, uma multiplicação rápida e aleatória originando, à posteriori, um tumor (Coronha, Camilo & Ravasco, 2011).

Uma célula “normal” pode sofrer alterações no DNA dos genes, designando-se por mutação genética, passando a receber instruções erradas que condicionam a sua funcionalidade. Estas alterações poderão ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que em células “normais” são inativos; quando mutados passam a ativos, transformando-se em oncogenes (responsáveis pela malignidade)

O cancro é definido como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento se encontra desordenado, aumentando de tamanho de forma mais ou menos constante, a partir de um determinado patamar perde a sua autonomia, dependendo de forma crítica do hospedeiro, para efeitos de nutrição. (KUMAR et al., 1994).

O cancro é um grupo complexo de doenças de grande latência, pois o tempo que decorre entre a exposição ao carcinogénico e a manifestação clínica da doença pode exceder os 20 anos. Existem múltiplas causas para este tipo de doenças, como a ação dos carcinogénicos químicos (tais como os produtos da pirólise do tabaco, combustíveis); físicos (como as radiações); biológicos (como agentes infecciosos (vírus ou bactérias), hormonas, inflamação crónica e stress oxidativo) (Santos, Teixeira; 2011).

Cancro é um termo genérico, no entanto outros termos são utilizados para o designar, tais como tumores malignos e neoplasias, sendo estes definidos de acordo com o tecido onde se iniciam. Assim, se o tumor tem origem nos tecidos epiteliais é designado como carcinoma, se tem origem no tecido conjuntivo é conhecido por sarcoma. (Santos, Teixeira, 2011)

Uma das características que especificam o cancro consiste na rápida proliferação de células anormais, que crescem além de seus limites habituais, podendo invadir partes adjacentes dos tecidos e consequentemente difundirem-se para outros órgãos, criando metástases. Estas são uma das principais causas de morte para o doente. (OMS, 2020)

2.1.1. Fases da Carcinogénese

A Carcinogénese ou também denominada por oncogénese, é o processo no qual as células saudáveis tornam-se cancerígenas, ou seja é o processo de formação de um cancro. Processo que ocorre lentamente pois pode demorar anos a que uma célula cancerígena prolifere e dê origem ao tumor. Este processo é dividido essencialmente em quatro fases:

- Iniciação: consiste numa mutação ou alteração genética numa única célula (efeito por agentes químicos, biológicos ou físicos), é a ocorrência de um acontecimento que modifica o genoma celular. As células encontram-se geneticamente alteradas, porém não é ainda possível detetar clinicamente o cancro. Sabe-se que uma única alteração no DNA não é suficiente para provocar a patologia, portanto são necessárias várias mutações em sequência, para o desenvolvimento de cancro. Por outro lado, apesar destas alterações ocorrerem o organismo está apetrechado com mecanismos de reparação, e além disso é necessário que estas ocorram em locais específicos, como genes supressores de tumores e protooncogenes. (Rubin, E. et al., 2006).

- Promoção: há a indução da proliferação celular das células iniciadas. Nesta fase as células alteradas estão dependentes de um estímulo para proliferar e estas são agrupadas em três grupos tendo em conta o mecanismo através do qual induzem o surgimento de neoplasias: a primeira classe são os genotóxicos (causam danos diretos ao DNA através da formação de aduções de DNA); os mitogénicos (ligam-se a recetores nas células e estimulam a divisão celular causando uma hiperplasia); e os citotóxicos (induzem dano tecidual levando à hiperplasia sem causar danos diretos ao DNA).

- Transformação maligna: O acumular destas alterações acima descritas, responsáveis pela perda do controlo fisiológico da proliferação celular e de múltiplas atividades biológicas, leva à transformação maligna (Stevens et al., 2002)
- Progressão (invasão e metastização): fase em que o crescimento celular se torna autónomo, ou seja independente do carcinogénico, corresponde ao ponto final da progressão (Stevens et al., 2002).

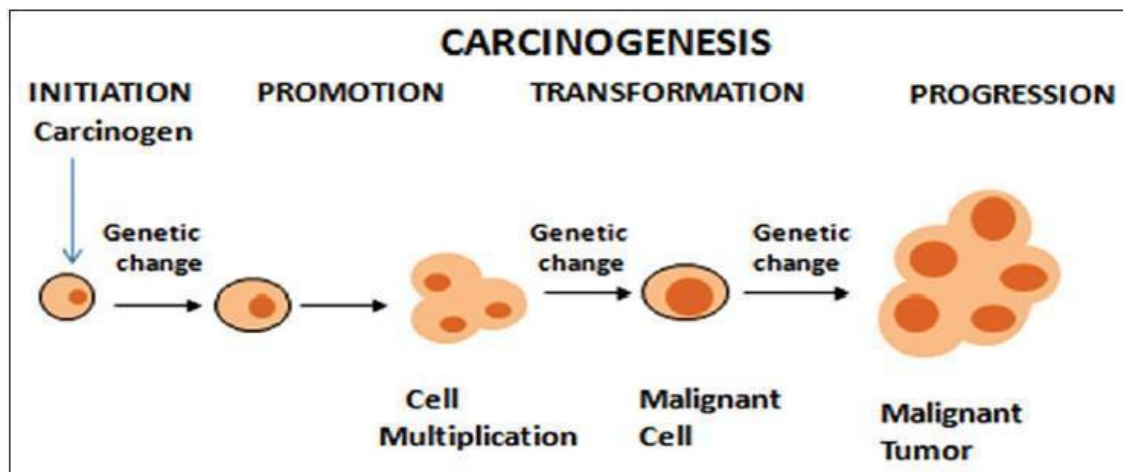


Ilustração 8 – Etapas da carcinogénese.

http://www.cancerjournal.net/articles/2014/10/4/images/JCanResTher_2014_10_4_846_139264_f1.jpg

2.2. Causas de cancro/ Fatores de risco do cancro

Como já referido, o cancro surge da transformação de células saudáveis em células tumorais através de um processo de vários estágios que geralmente progride de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno. (OMS, 2020)

Na maioria dos casos, não se consegue identificar uma causa específica para uma pessoa desenvolver cancro e outra não. No entanto, com o decorrer das várias investigações foram-se demonstrando que determinados fatores podem estar relacionados com o aparecimento do mesmo, denominando-se por fatores de risco. (Nacional Cancer Institute, 2015)

Os fatores de risco são muito importantes porque determinam a probabilidade de desenvolver cancro, contudo não é decisivo que uma pessoa exposta a um determinado fator de risco vá, no futuro, obrigatoriamente desenvolver. Este tema é bastante complexo uma vez que duas pessoas podem estar expostas ao mesmo fator de risco mas apenas uma desenvolver cancro e a outra não. E é aqui que se tem que ter em conta que a carga genética de cada indivíduo influencia também o seu desenvolvimento. Os fatores de risco mais conhecidos e mais comuns são: o envelhecimento; o consumo de tabaco, pois

algumas substâncias cancerígenas são partes integrantes da própria planta do tabaco e outras formam-se aquando da combustão do tabaco ou durante a transformação, cura ou armazenamento, como o benzeno, o formaldeído e as nitrosaminas específicas do tabaco (IARC, 2016); a excessiva exposição solar; a radiação ionizante; o consumo de álcool; determinados produtos químicos (amianto, que consiste numa variedade fibrosa de seis minerais metamórficos de ocorrência natural, que se inaladas podem depositar-se e manter-se vários anos em alguns órgãos como os pulmões (DGS, 2020); benzeno); alguns vírus e bactérias; algumas hormonas; praticar uma dieta pobre; sofrer de obesidade; inércia... Com o passar do tempo vários fatores podem também agir em conjunto e causar cancro (National Cancer Institute, 2015 & Liga Portuguesa Contra o Cancro, 2020).

2.3. Epidemiologia do cancro

No passado ano 2018 foram registados no mundo 18,1 milhões de novos casos de cancro; 9,6 milhões de mortes e 32,6 milhões casos de prevalência de cinco anos. Dos novos casos: 8,88 milhões (52%) no sexo masculino e 8,2 milhões (48%) no sexo feminino; cerca de 57% desses novos casos, 65% dos óbitos e 48% dos casos prevalentes de cancro ocorreram nas regiões menos desenvolvidas. Quatro em cada dez casos cancros são identificados em países de desenvolvimento humano baixo ou médio (países em desenvolvimento). (Cancer Research UK, 2018)

Os quatro tipos de cancro mais comuns em todo o mundo são: o cancro do pulmão, da mama, do colorretal e da próstata. O cancro do pulmão é o cancro mais comum no sexo masculino (mais de 1 em cada 10 casos de cancro diagnosticados em homens)

Estima-se que em 2030 ocorram cerca mais 62% de incidência de novos casos de cancro.

A incidência e mortalidade dos diferentes cancros têm flutuações que dependem do tipo de cancro, da região geográfica a que se refere, bem como do período de tempo considerado. Estas oscilações refletem questões relativas à própria biologia do cancro, mas também, e em grande medida, aos novos métodos de prevenção, deteção e tratamento que têm vindo a ser desenvolvidos. (SILVA, Filipa S. 2013).

A taxa geral de incidência de cancro padronizada por idade é quase 25% maior em indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, com taxas de 205 e 165 casos por 100.000 pessoas-ano, respetivamente.

Nos indivíduos de sexo masculino, podemos verificar que a taxa (por 100 000) é mais elevada na Europa Central e Oriental (173 mortes/ano) e mais baixa na África Ocidental (69 mortes/ano). Em contraste, as taxas mais elevadas em indivíduos do sexo feminino são observadas no leste da África (111 mortes/ano), sendo as mais baixas na América Central (72 mortes/ano).

Como já referido, dados de 2018, demonstram que os cancros com maior taxa de incidência a nível mundial são o cancro do pulmão, o cancro da mama e o cancro colorrectal. Contudo apesar de mais incidentes, não são necessariamente os mais mortais. Os que têm maior taxa de mortalidade são cancro do pulmão, do estômago e do fígado são os responsáveis pelo maior número de mortes a nível mundial. Sobressaem outros ainda, que afetam p sexo feminino quase em exclusivo: o cancro da mama e o do colo do útero. (IARC, 2018)

Quanto ao tempo de prevalência dos 5 anos podemos enumerar o cancro da mama, seguido do cancro da próstata e por último o colorretal.

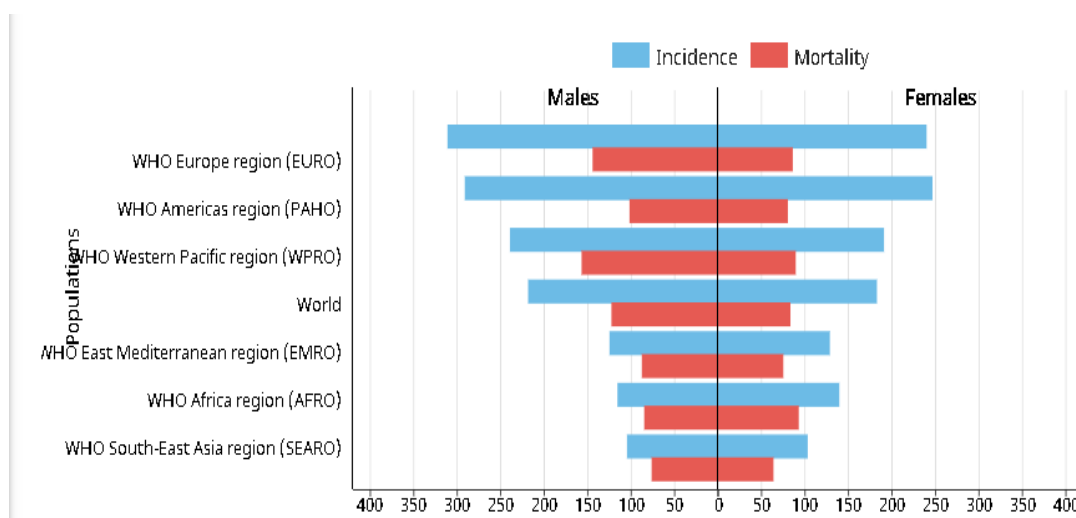


Gráfico 1 - Estimativa da taxa de incidência e mortalidade de cancro no mundo (por 100 000) IARC (2018)

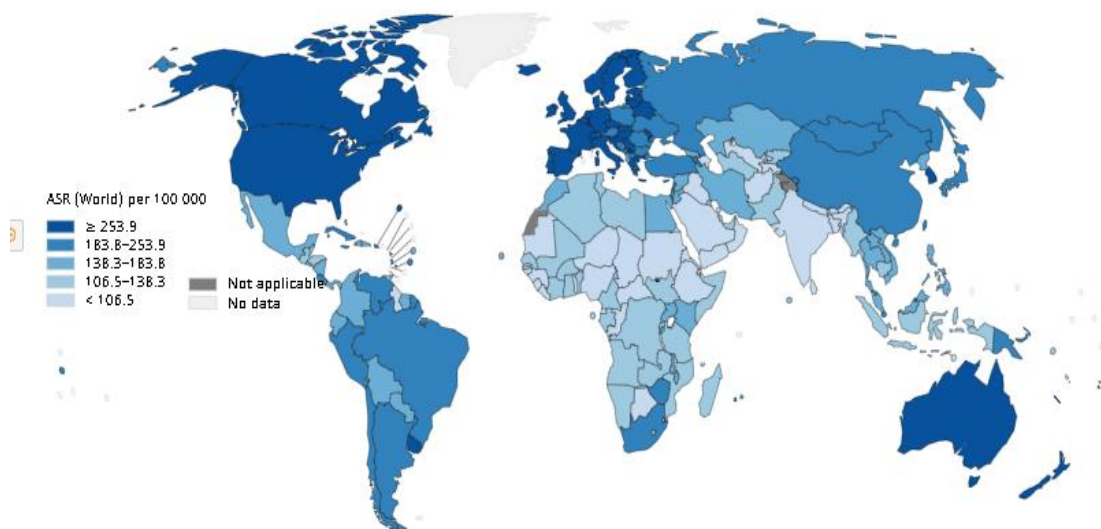


Gráfico 2: Taxas estimadas de idade padronizada (mundial), de casos incidentes em ambos os sexo em 2012. IARC (2018)

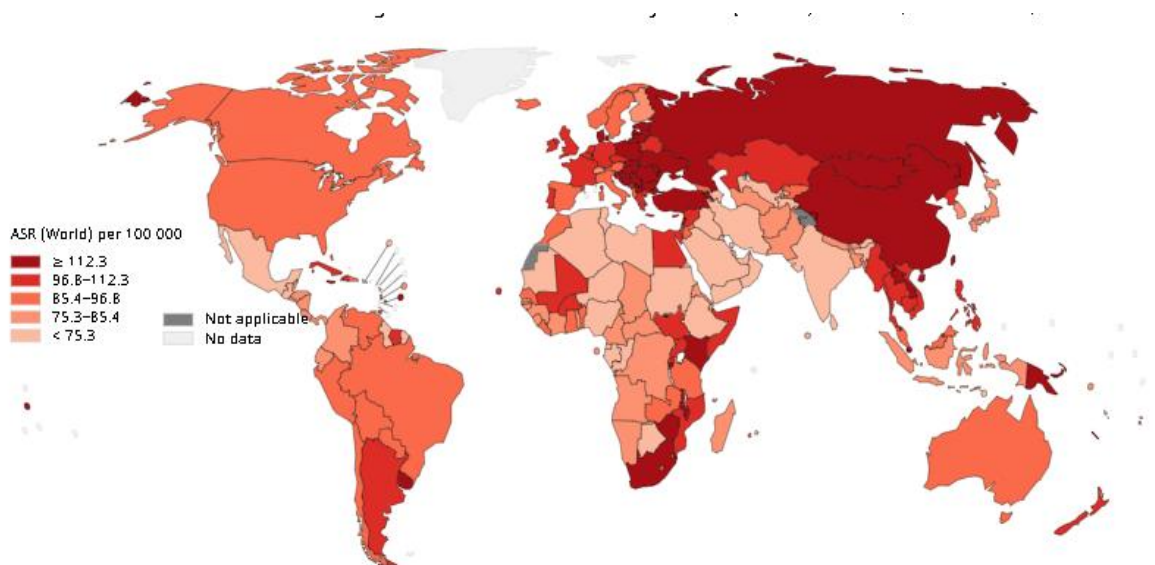


Gráfico 3 - Taxas estimadas de idade padronizada (mundial), de casos mortais em ambos os sexo em 2012. IARC (2018)

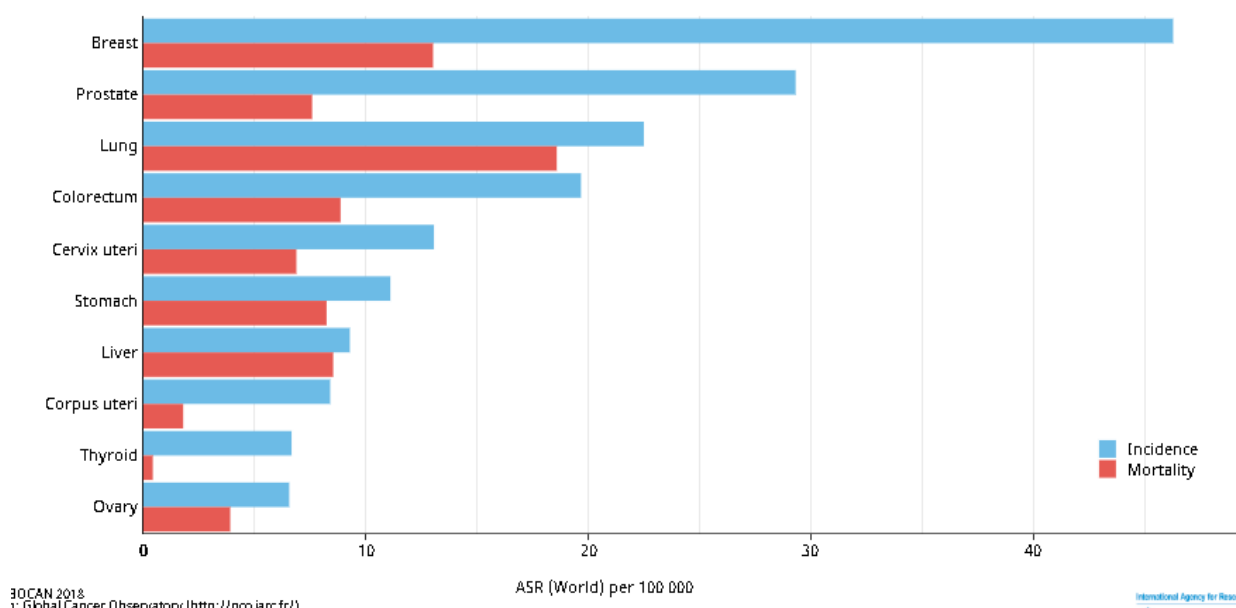


Gráfico 4 - Taxas estimada de mortalidade e incidência de idades-padrão em ambos os sexos, a nível mundial no ano 2018. (IARC, 2018)

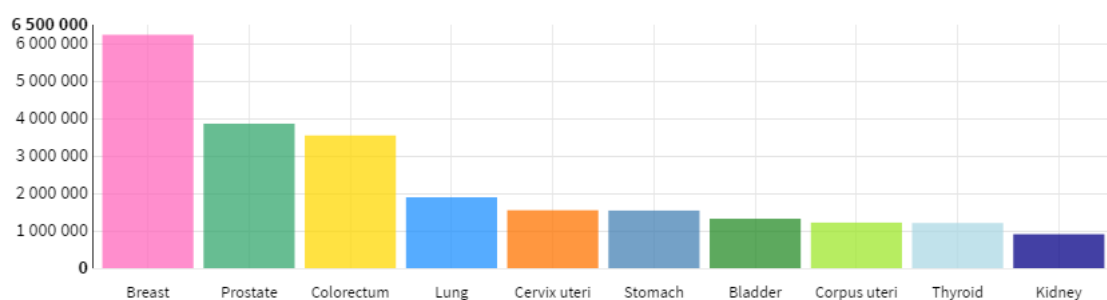


Gráfico 5 – Números estimados de prevalência de 5 anos, dos varios cancros em ambos os sexos, em 2012. IARC (2012)

Quando nos direcionamos para os estudos feitos em Portugal, verifica-se a inexistência de muita informação. Contudo os dados mais recentes revelam que existiram cerca de 27900 mortes em Portugal por doença oncológica (SNS,2016). A incidência de cancro em Portugal tem vindo a aumentar regularmente, entre 2015 e 2016 verificou-se um aumento de cerca de 3% de casos.

Atualmente, devido aos avanços na ciência (rastreios) consegue-se detetar a patologia numa fase bastante precoce evitando um aumento da mortalidade pela doença, mas não é possível travar a sua morbilidade. Se, por um lado, o tempo de sobrevida com a doença parece ter aumentado (Carneiro et al., 2011), a exposição aos fatores de risco

anteriormente referidos, também cresceu. Atendendo ao exposto, comprova-se que os elevados números de incidência e reduzidos números de mortalidade traduzem numa maior sobrevivência.



Gráfico 6 –Evolução da taxa de incidência de cancro, até 2010 e Portugal (IARC, 2018)

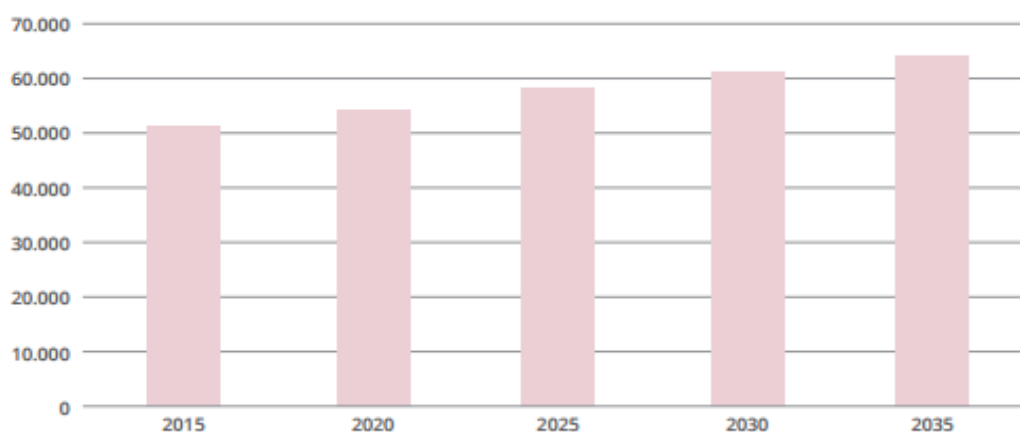


Gráfico 7 - Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal até 2035 (IARC, 2018)

2.4. Cancro da mama

O cancro da mama é um dos tumores malignos mais frequentes. Tem uma incidência muito mais elevada no sexo feminino e é o tumor mais frequente nas mulheres portuguesas. É a principal causa de morte neste sexo, nomeadamente entre os 35 e 54 anos. Provoca mais perda de potenciais anos de vida que qualquer outro cancro, porque ocorre numa população mais jovem do que a maioria dos outros tipos de cancros.

O cancro da mama surge quando as células que crescem/multiplicam-se de forma anormal localizam-se no tecido mamário. Quase sempre, as células que degeneram pertencem a uma de duas estruturas da glândula mamária : os lóbulos ou os ductos mamários.

A principal função da mama feminina consiste na produção de leite para amamentação, para que isso aconteça é necessário que ocorram diversas transformações, já a mama masculina permanece primitiva. São estas mesmas transformações que podem expor a mama a episódios que despoletam o cancro (razão que torna a mulher mais suscetível).

A grande maioria dos cancros que afetam a mama desenvolvem-se na glândula mamária, mas aqui também o sistema linfático pode ser decisivo na evolução da patologia. Isto porque, os vasos linfáticos recolhem os líquidos em excesso na mama para serem entregues ao sistema circulatório, podendo funcionar assim como porta de entrada para as células malignas para outros órgãos.

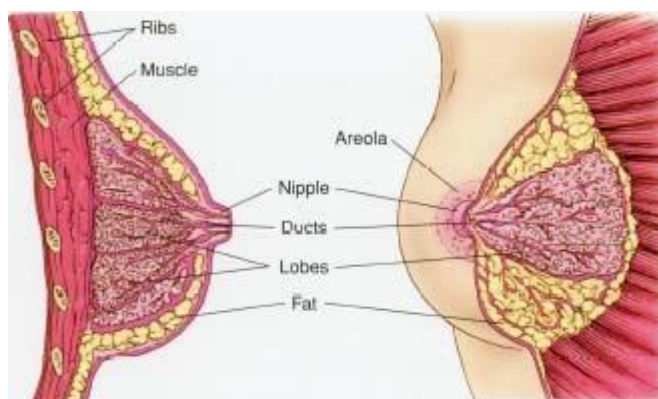


Ilustração 9 – Anatomia da mama. <http://www.humanillnesses.com/original/At-Ca/Breast-Cancer.html>

O cancro da mama é o cancro mais comum entre o sexo feminino, sendo também a principal causa de morte por cancro nas mulheres, a nível mundial.

Dados de 2018 estimam que há 2,08 milhões de novos casos/ano, ou seja 25% de todos os tipos de cancro, corresponderam ao da mama (dados mundiais) e 626 mil mortes/ano. Estamos perante o cancro mais frequente nas mulheres, tanto nos países menos desenvolvidos 883 000 casos) como nos mais desenvolvidos (794 000 casos).

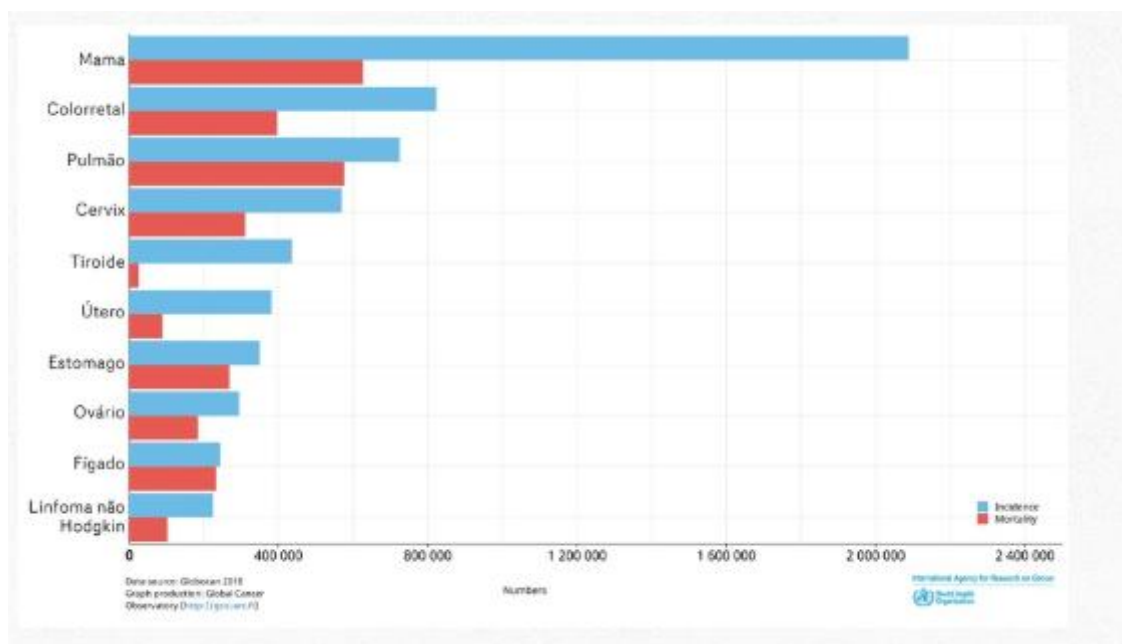


Gráfico 8 – Incidência e Mortalidade estimados dos vários tipos de cancro mais frequentes no sexo feminino. IARC (2018)

É o quinto cancro que mais mata, com cerca de 522 000 mortes em 2012.

Geograficamente existem grandes diferenças relativas a este cancro, especialmente entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento. O aumento do número de mulheres afetadas é muito mais acentuado nos países com um estilo de vida dito ocidental. Diversos países do Norte e Oeste da Europa (Reino Unido, Dinamarca, Holanda...) e os EUA, têm taxas de incidência superiores a 69 casos/ 100.000 habitantes por ano. Enquanto os países Asiáticos, demonstram uma incidência bastante inferior – abaixo dos 26 casos/ 100.000 habitantes por ano. (IARC, 2018)

Estima-se que 1 em 8 mulheres e 1 em 870 homens serão diagnosticados com cancro da mama durante a sua vida.

De 1989 a 2007 demonstrou-se que as taxas de mortalidade por cancro de mama diminuiriam. E desde 2007 até agora, estas mesmas taxas têm se mantido constantes em mulheres com menos de 50 anos, mas continuaram a diminuir em mulheres mais velhas. Acredita-se que essas diminuições sejam o resultado da implementação de rastreios que permitem a deteção precoce dos cancros. (ASC, 2017)

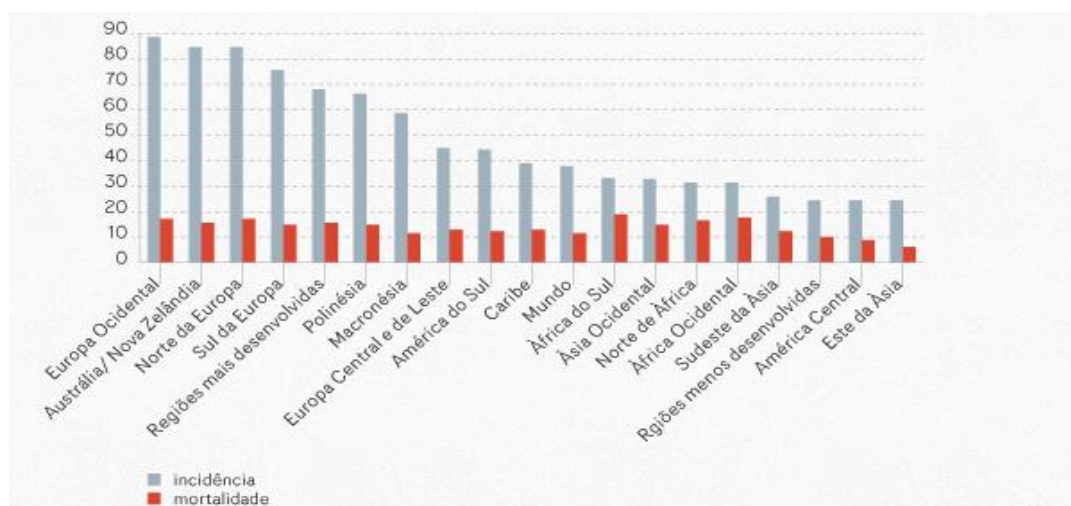


Gráfico 9 – Incidência e Mortalidade padronizadas pela idade, para o cancro da mama na mulher, no mundo, amostragem de 100.000 pessoas. IARC (2012)

Em 2014 só no Reino Unido foram relatados cerca de 55.200 novos casos de cancro de mama, o que se traduz em cerca de 150 casos diagnosticados todos os dias. Desde o início da década de 1990, as taxas de incidência de cancro de mama aumentaram cerca de um quinto (19%) no Reino Unido, embora isso inclua um aumento nas mulheres (24%) e uma estabilidade nos homens. (Cancer Research UK, 2015)

Nos Estados Unidos estima-se que em 2017 existiram cerca de 252.710 novos casos em mulheres e 40.610 mortes por cancro de mama. (ASC, 2017)

Em Portugal a taxa de incidência tem vindo a aumentar. Entre 2009 e 2010 foi detectado um aumento de 4% dos casos de tumores malignos. (DGS, 2015) Enquanto no ano 2012, foram relatados 5300 novos casos por ano e cerca de 1500 mortes derivadas ao cancro da mama por ano. (SILVA, Filipa S. 2013). Podemos verificar que o cancro da mama é o tumor maligno que tem uma maior taxa de incidência no nosso país, tanto no ano 2010 (estudo sem diferenciação de sexos), como no ano 2012 (apenas analisado o sexo feminino). (DGS, 2015)

TAXA DE INCIDÊNCIA DE TUMORES MALIGNOS (100000 HABITANTES)		
	Taxa bruta	Taxa pad. (pop. Eur.)
Próstata	120,3	90,5
Mama	62,5	50,2
Cólon	47,6	32,1
Traqueia, Brônquios e Pulmão	35,8	26,5
Estômago	27,8	18,9
Reto	22,7	15,8
Corpo do Útero	17,8	12,4
Bexiga	17,3	11,3
Linfoma não Hodgkin	17,1	12,9
Glândula Tiroideia	15,3	13,7
Total	444,5	330,3

Tabela 2 – Taxa de incidência de cancro maligno em Portugal (100.000) no ano 2010. (RORENO, Run; 2010)

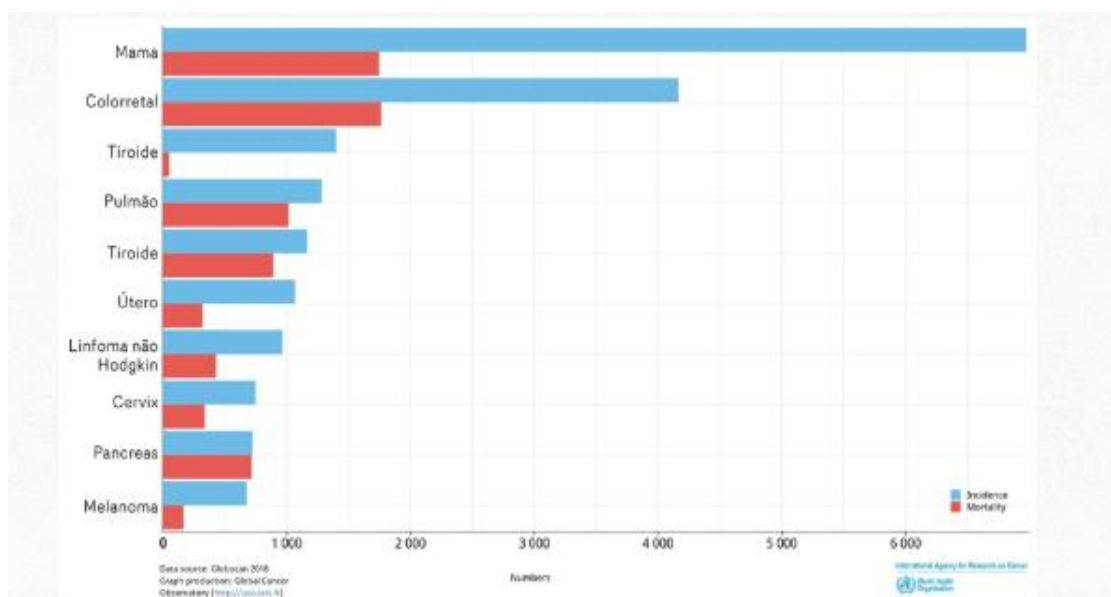


Gráfico 10 - Incidência de câncros que afetam sexo feminino, em Portugal no ano de 2018

<http://www.cancronafamilia.com/pt/cancro-da-mama/conhecer/numeros-geografia/>

2.5. Diagnóstico do cancro

A taxa de morbilidade e mortalidade associada ao cancro pode diminuir com a rápida deteção e tratamento. Quanto mais precoce for o diagnóstico, maior será a probabilidade do cancro responder de forma eficaz ao tratamento, provocando consequentemente uma maior taxa de sobrevivência, um menor custo associado aos tratamentos e menos morbilidade. (IARC, 2018)

Segundo a OMS, um diagnóstico precoce assenta em três passos fulcrais:

1. Consciencialização do problema e acesso aos cuidados de saúde;
2. Avaliação clínica e diagnóstico;
3. Acesso ao tratamento.

Na presença de um diagnóstico tardio, os doentes passam a ser diagnosticados em estadios igualmente tardios, quando o tratamento curativo muitas das vezes deixa de ser uma opção.

Uma das melhores formas de diagnóstico precoce são os rastreios. Rastreios são testes cujo objetivo é identificar indivíduos com anormalidades sugestivas de um cancro específico, que não tenham desenvolvido nenhum sintoma e encaminhá-los posteriormente para diagnóstico e tratamento.

Segundo a OMS, um rastreio é uma intervenção no âmbito da saúde pública muito mais complexa em comparação com o diagnóstico precoce. Exemplos de métodos de rastreio são: teste de HPV (para o cancro do colo do útero), citologias de PP (para cancro cervical) e mamografias (para o cancro da mama).

Para realização de diagnóstico recorre-se aos exames imagiológicos que permitem visualizar os tecidos mamários e suas possíveis alterações. Exemplos: Ecografia, Mamografia, Ressonância Magnética...

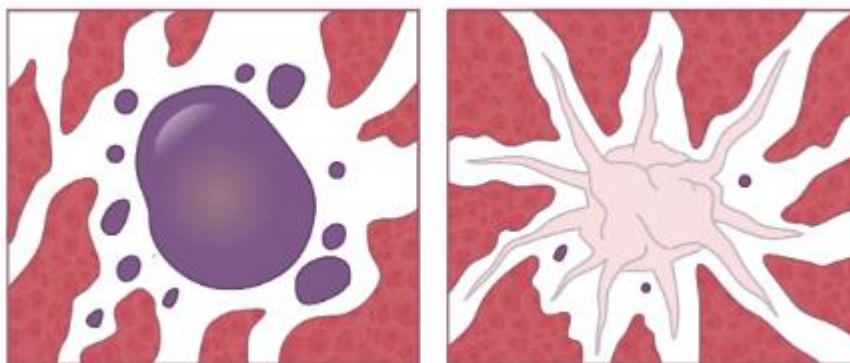


Ilustração 10 – Diferenças entre um quisto e um tumor maligno por uma ecografia.

<https://www.cancronafamilia.org/pt/cancro-da-mama/detect-diagnose/diagnose/imaging-tests>

2.6. Tratamento do cancro

O tratamento do cancro depende sempre de qual é o tipo de cancro, do estadio da patologia e do doente (estado de saúde, idade...). Geralmente o objetivo é eliminar na

totalidade o cancro, mas em alguns casos consiste apenas em controlar a patologia e a sintomatologia associada ao mesmo. O plano delineado no início pode se ir alterando ao longo do tempo caso hajam variações.

De uma forma generalista, o tratamento assenta em: cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Adicionalmente tem vindo a utilizar-se cada vez mais células estaminais indiferenciadas de forma a fortalecer o sistema imunitário do doente para que consiga aumentar as doses de quimio/radioterapia. A associação de fármacos ou até mesmo de tratamentos depende do cancro.

A radioterapia e a cirurgia são terapêuticas locais, ou seja atuam numa área específica do organismo. Enquanto a quimioterapia é uma terapêutica sistémica, que entra na corrente sanguínea, “destruindo” ou controlando o tumor.

Quimioterapia é o tratamento com fármacos que podem ser administrados por via intravenosa ou por via oral. Estes fármacos, denominados por citotóxicos/citostáticos percorrem o organismo através da corrente sanguínea para atingir as células cancerígenas na maioria das partes do corpo.

Os fármacos mais utilizados na quimioterapia são as Antraciclinas (doxorrubicina - DOX e a epirubicina - EPI); os Taxanos (paclitaxel - Taxol e docetaxel - Taxotere); o 5-fluorouracilo (5-FU); as Ciclofosfamidas e a Carboplatina. (INFARMED, 2017). Na maioria das vezes, são utilizadas combinações de 2 ou 3 destes fármacos. (EMA, 2017)

Devido aos efeitos devastadores da quimioterapia, cada vez existe mais investigação para uma alternativa a este tratamento com os mesmos efeitos positivos mas menor efeitos secundários. Podendo ser a utilização das RIPs em quimioterapia uma alternativa promissora.

CAPÍTULO III

3.1. A apoptose

O termo “morte celular programada” (PCD, programmed cell death) foi descrita originalmente como uma série de acontecimentos que conduzem à morte da célula durante o seu desenvolvimento (Sinha Hikim & Swerdloff, 1999). Inicialmente este fenómeno foi denominado por necrose, contudo em 1972, alterou-se o nome para apoptose (perda das folhas das árvores em grego). A apoptose é fundamental para a remoção de células danificadas e potencialmente perigosas para os organismos, de forma a assegurar a homeostase estrutural e funcional dos tecidos. A apoptose surge em resposta a estímulos específicos de lesão celular, externos (privação de fatores de sobrevivência, exposição a radiações e agentes químicos) e internos (lesão do DNA e organelos) (Henriksen, Kulmala, Toppari, Mehrotra, & Parvinen, 1996). O principal papel da apoptose tem vindo a ser reconhecida na patogénese de diversas doenças humanas, nomeadamente cancro (Sinha Hikim & Swerdloff, 1999). O processo apoptótico progride em quatro fases distintas: iniciação, mediação, execução (durante a qual ocorrem a maioria das modificações estruturais e bioquímicas) e remoção (restos celulares são removidos por fagocitose) (Evan et al, 1998).

A apoptose está associada a alterações morfológicas e bioquímicas, as quais se distinguem a nível citoplasmático e a nível nuclear. Ao nível do citoplasma há uma redução do volume da célula, e consequente diminuição do contato com as células vizinhas, vacuolização do citoplasma, e formação de corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos do tecido sem causar uma resposta inflamatória. Ao nível do núcleo observa-se uma fragmentação do invólucro nuclear e uma marginalização periférica da cromatina seguida de digestão internucleossómica do DNA. Para todas estas alterações é fulcral a ativação das enzimas proteolíticas que medeiam a clivagem do DNA em fragmentos oligonucleossómicos. (Oliveira, Ana Luisa & Ricardo, Garcia; 2007)

Em contraste à morte celular por apoptose, a necrose é um processo passivo que não requer gastos de energia pela célula e ocorre em resposta a uma enorme variedade de agentes nocivos. A necrose afeta geralmente um grupo de células contíguas e é caracterizado pelo aumento de volume da célula e seus organelos, resultando na lise da membrana celular (Leist & Jäätelä, 2001) .

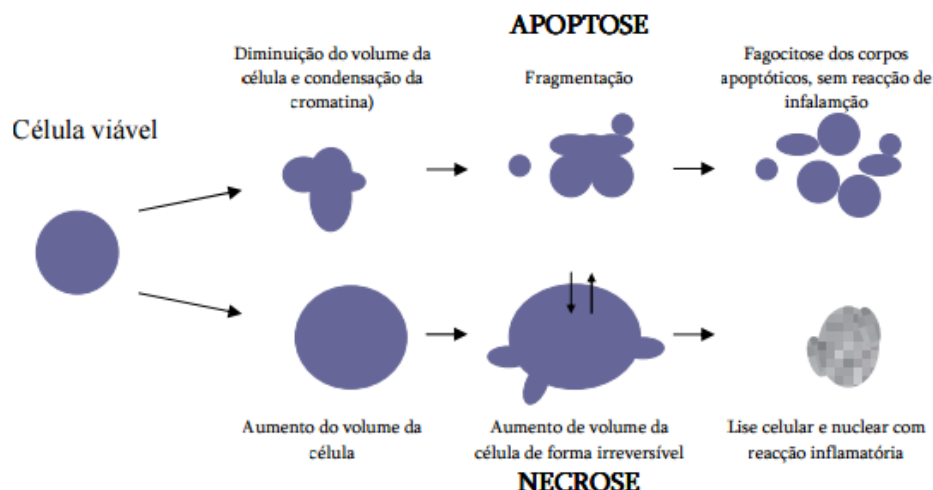


Ilustração 11 – Diferenças entre os processos Apoptose e Necrose.

<https://ria.ua.pt/bitstream/10773/715/1/2007001270.pdf>

As células apoptóticas geralmente exibem uma diversidade de modificações bioquímicas, como a fragmentação do DNA e clivagem de proteínas. No primeiro caso, as células apoptóticas exibem quebras típicas do DNA em grandes fragmentos de 50 a 300 Kb. Por consequência há clivagem internucleossômica do DNA em oligonucleossomas. Na clivagem de proteínas a hidrólise de proteínas envolve a ativação de vários membros da família das cisteínas - proteases - caspases, é uma das características específicas da apoptose. A clivagem por caspases das proteínas do citoesqueleto e da estrutura nuclear produz as alterações estruturais nucleares e citoplasmáticas

3.2. As RIPs na Oncologia

Apesar do notável avanço da quimioterapia (Blagosklonny, 2011), uma cura definitiva para o cancro ainda está longe de ser encontrada e o efeito da quimioterapia é limitado uma vez que acarreta inúmeros efeitos adversos que debilitam a qualidade de vida dos doentes. Para superar estas limitações dos citostáticos tradicionais, houve a necessidade de se investigar vários tipos de candidatos a fármacos.

Muitas RIPs de várias plantas têm vindo a demonstrar grande eficácia no combate ao cancro, tanto *in vitro* com *in vivo*.

Uma vez que a quimioterapia convencional tem efeitos secundários muito graves, a procura de tratamentos alternativos é evidente e fulcral para o aumento da qualidade de vida dos doentes. As possibilidades de tratamento complementar para a terapia de cancro

estão a aumentar na procura devido aos efeitos secundários graves dos citostáticos padrão utilizados na terapia de primeira linha.

Overview of RIPs with antitumor activity				
RIP	Source	Type of tumor	Study model	Refs
Type I RIP				
α -Luffin	<i>Luffa cylindrica</i>	Placental choriocarcinoma, hepatoma, breast cancer	<i>In vitro</i>	[42]
Gelonin	<i>Gelonium multiflorum</i>	Bladder cancer	<i>In vitro</i>	[44]
MAP30	<i>Momordica charantia</i>	Brain glioblastoma, breast carcinoma, epidermoid carcinoma, liver hepatoma, myeloma neuroblastoma and prostate carcinoma	<i>In vitro</i>	[10,34,35]
MCP30	<i>M. charantia</i>	Prostate cancer	<i>In vitro</i>	[37]
α -MMC	<i>M. charantia</i>	Lung, colon, liver, breast and epidermal cancer	<i>In vitro</i>	[38]
Pokeweed	<i>Phytolacca americana</i>	T-cell leukemia virus	<i>In vitro</i>	[36]
Saporin	<i>Saponaria officinalis</i>	Ovarian teratocarcinoma	<i>In vivo</i> (mouse)	[64]
		Prostate cancer	<i>In vitro</i>	[64]
TCS	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Hepatocellular carcinoma	<i>In vitro</i>	[48,65]]
Type II RIPs				
Ebulin I	<i>Sambucus ebulus</i>	Cervix epithelioid carcinoma	<i>In vitro</i>	[21]
Foetidissimin II	<i>Cucurbita foetidissima</i>	Adenocarcinoma and erythroleukemia	<i>In vitro</i>	[20]
Mistletoe	<i>Viscum album</i>	Ovarian, colorectal, renal and breast cancer	<i>In vitro, in vivo</i> (human)	[23]
Nigrin b	<i>Sambucus nigra</i>	Cervix epithelioid carcinoma	<i>In vitro</i>	[66]
Riproximin	<i>Ximenia americana</i>	Colorectal cancer	<i>In vivo</i> (rat)	[67]

Tabela 3: Listagem de RIPs com atividade anti-tumoral. (Puri et al., 2012. Ribosome-inactivating proteins: current status and bio-medical applications)

Em 2006 percebeu-se que a Ricina e outras RIPs do mesmo tipo podem ser mais prejudiciais às células malignas (do que às células saudáveis) porque têm uma taxa de síntese de proteínas mais elevada enquanto proliferam ativamente e também porque, alteradas, podem ser mais sensíveis às toxinas (Voss, Eyol, & Berger, 2006). Neste estudo concluiu-se que a alegada atividade antitumoral dos extractos de *Viscum album* é atribuída à Viscumína (RIP tóxico do tipo II) e que os extractos de *Ximenia americana* utilizados em África para tratar o cancro contêm também uma RIP tóxica de tipo II chamada Riproximina. Concluindo portanto que estas assim como também outras RIPs podem ter algum efeito benéfico se utilizadas em oncologia, não apenas atuando diretamente em células cancerígenas, mas também exercendo forte estimulação do sistema imunológico e induzindo a produção de citocinas, como visto em células sob o efeito de vários RIPs (Yamasaki et al., 2004).

Tem sido demonstrada em diversos estudos a atividade da Tricossantina (RIP – TCS) contra um enorme repertório de cancros, entre os quais cancro da mama. (Akkouh et al., 2015). A TCS é extraída do tubérculo da erva medicinal chinesa Trichosanthes kirilowii Maximowicz (Tian Hua Fen), tem sido usada clinicamente como um medicamento abortivo. Contudo o TCS exibe outros potenciais encorajadores para futuras aplicações clínicas tais como, no vírus da imunodeficiência humana (HIV) e efeitos antitumorais, como acima descrito. O TCS pertence à RIP de tipo 1, que é um polipeptídeo de cadeia única que pode inativar ribossomas eucarióticos, clivando a ligação N-glicosídica na

adenina-4324 do 28 S rRNA. Recentemente, verificou-se que o TCS não exibe apenas uma atividade in vitro antitumoral muito alta para células tumorais comuns, este também atua em células cancerígenas multirresistentes, podendo assim induzir a imunossupressão nas respostas linfoproliferativas T não-tóxicas em humanos, regular positivamente a expressão do gene da interleucina (IL)-4 e suprimir o interferão (IFN) (proteína produzida pelos leucócitos e fibroblastos para interferir na replicação de fungos, vírus, bactérias ou células tumorais e estimular a atividade de defesa de outras células alterando assim a expressão genética) (Chen, Y et al. 2017). Vários estudos demonstraram que o TCS exerce uma alta toxicidade seletiva para uma ampla gama de células tumorais in vitro e in vivo (Tabela 4). Estudos recentes demonstraram que a TCS pode efetivamente inibir a proliferação e a viabilidade das células cancerosas, induzindo a apoptose em diversas linhas de células tumorais e em modelos animais. (Shaw, P.C. et al, 2005)

System	Tumor Type	Tested Cell Line	Tested Model
Female reproductive	Breast cancer	MCF-7, BT-474 and MDA-MB-231 [60]	Nude mice [60]
	Cervical cancer	HeLa [78] and Caski cells [79]	-
	Choriocarcinoma	JAR [59] and BeWo [80]	-
Immune	Lymphoma	SU-DHL-2 cells [61]	-
Digestive	Colon cancer	CT-26 [81]	-
	Hepatoma	HepA-H cells [81]	-
	Gastric cancer	MCG803 [82]	-
Blood	Leukemia	HL-60 [83] and K562 [84]	-
Respiratory	Lung cancer	A549 cells [85] and 3LL [86]	Nude mouse [85] Lewis rat murine models [86]
	Nasopharyngeal cancer	CNE1 and CNE2 [87]	-
Male reproductive	Prostate cancer	RM-1 [88]	-
Integumentary	Melanoma	B16 [89]	-
Nervous	Glioma	U87 and U251 [90]	-

Tabela 4- Atividade Anti-tumoral da TCS, e estudos in vitro e em modelos animais

Vários estudos concluíram que a TCS pode regular várias vias de sinalização para determinar o destino das células tumorais e induzir apoptose destas células, incluindo a via de sinalização de apoptose mediada por óxido nítrico (NO), stresse oxidativo, via de sinalização cAMP e vias de sinalização de stresse reticulum mitocondrial e endoplasmático. Outros organelos, como ribossomas, microfilamentos e microtubulares, também desempenham funções na via de apoptose induzida por TCS. (Cai, Y et. al, 2011)

Kang, M et al, em 2013, realizou estudo em ratinhos, onde demonstrou que a TCS suprime a atividade da telomerase e induz a apoptose celular para inibir o

crescimento das linhas celulares do carcinoma nasofaríngeo, CNE1 e CNE2. A TCS não só afeta diretamente as células tumorais, mas também aumenta a imunidade antitumoral através da regulação da expressão e modulação da interacção do gene supressor de tumores TSLC1 e da célula T.

Os mecanismos anticancerígenos desta RIP incluem a inibição da proliferação, paragem do ciclo celular e indução de apoptose (via extrínseca e intrínseca) das células cancerígenas. Estes mecanismos dependem do tipo de células tumorais que se apresentam (Sha et al., 2013). A Tricossantina demonstrou ações antiproliferativas e indutoras da apoptose em ambas as células MDA-MB-231 independentes de estrogénio e células MCF-7 humanas dependentes de estrogénio e induziu também a paragem do ciclo celular. A apoptose das células tumorais induzidas por Tricossantina foi provocada pela ativação de ambas as vias caspase-8 e caspase-9 reguladas envolvendo a ativação da caspase-3 e clivagem de PARP melhorada.

Inicialmente, a toxicidade das RIPs para células animais foi atribuída à sua capacidade de inibir a síntese proteica levando à morte celular por necrose. No entanto, há um crescente número de evidências que indicam que a principal causa de toxicidade das RIPs nas células é a sua capacidade de induzir apoptose (Das, Sharma, & Mishra, 2012)

Mais tarde testou-se a capacidade da Dioxicina 2 (RIP da *Phytolacca dioica* L.) induzir a apoptose (em concentrações próximas à sua IC50), em células COLO 320 e HeLa. Ambas apresentaram características morfológicas próprias da apoptose, uma forte ativação dose-dependente de caspases e uma desagregação do DNA nuclear em fragmentos oligonucleossómicos. A estas concentrações os ribossomas foram inativados, o que sugere que a morte celular pode ocorrer por uma combinação de necrose e apoptose. (Iglesias et al., 2016)

Uma abordagem comum como tratamento complementar é a utilização de extratos aquosos de *Viscum album* L. (Santalaceae). A atividade terapêutica destes extratos é atribuída à sua lectina (*Viscumina*), como já referido a cima. Vários estudos para a terapia do cancro da mama, guiaram-se em torno de preparações à base de plantas como o *Viscum album* L. (Santalaceae). As suas RIPs responsáveis por estes efeitos terapêuticos são as Lectinas (ML-I, ML-II e ML-III). (Pryme, Bardocz, Pusztai, & Ewen, 2006). Actualmente, a grande maioria das investigações nesta planta incidem particularmente na lectina ML-I.

O efeito anticancerígeno da ML-I depende das atividades exercidas tanto pela cadeia A como pela cadeia B. Enquanto os hidratos de carbono que estão ligados à cadeia B medeiam a captação celular da hololectina; a cadeia A citotóxica é responsável

por inibir, por catalisação da hidrólise da ligação N glicosídica na adenina ao ribossoma, o alongamento da biossíntese protéica, levando ao processo de apoptose ou morte celular por necrose (Bantel, Engels, Voelter, Klaus, & Sebastian, 1999). Acredita-se que os aumentos significativos da apoptose das células cancerígenas observados em 20 pacientes com carcinoma mamário que receberam ML-1 por injeções subcutâneas esteja envolvido com este mecanismo (Marvibaigi, Supriyanto, Amini, Abdul Majid, & Jaganathan, 2014).

Algumas experiências recentes, realizadas em culturas de células e modelos animais sugerem que as atividades citotóxicas e antitumorais desta planta podem ser mediadas através de diferentes mecanismos, tais como a indução de apoptose e/ou necrose; a inibição da progressão do ciclo celular; ou até a ativação de sistema imunitário específico/ inespecífico. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares precisos não são completamente conhecidos.

Foi realizado um estudo comparativo das propriedades biológicas/químicas entre a lectina do *Viscum album C.* (KML-C) e da lectina do *Viscum album L.* (EML-1). Do qual se concluiu que a atividade citotóxica de KML-C contra as células cancerígenas era mais forte do que a EML-1. Foi reportada a indução da apoptose caracterizada por alterações morfológicas de núcleos apoptóticos e fragmentação do DNA em células tumorais incubadas com KML-C, estes resultados mostraram que a adição de Zn^{2+} (catião de zinco) bloqueia significativamente a indução da apoptose, o que sugere que a atividade antitumoral de KML-C resulta de endonucleases dependentes de Ca^{2+} Mg^{2+} (catião de cálcio e magnésio) e consequente da indução da apoptose. (Yoon et al., 1999)

Um grupo de cientistas estudou os efeitos de diferentes concentrações de Iscador® (extrato de *Viscum*) em nove linhagens de células humanas cancerígenas relacionando a indução de apoptose e o mecanismo de ação. Uma regressão precoce do ciclo celular seguida da indução da apoptose (dependente da dosagem) na linha celular particular do cancro da mama, foram os resultados obtidos. (Harmsma, Ummelen, Dignef, Tussenius, & Ramaekers, 2006) Ainda neste estudo é referido que este extrato poderá induzir a apoptose através da ativação da caspase 8 e subsequentemente pela perda do potencial mitocondrial que, por sua vez, liberta o citocromo C no citosol e ativa a caspase 9.

Um estudo, *in vitro* e *in vivo*, foi conduzido de forma a investigar a eficácia terapêutica do GAP31 (proteína da Gelonina) e o MAP30 (proteína da Momordica) em cancros da mama independentes do estrogénio e altamente metastáticos (células MDA-MB-231) assim como o efeito destes no gene HER2 (gene específico do cancro da mama). *In vitro*, ambas as proteínas inibiram a proliferação das células MDA-MB-231 e

também a expressão do HBR2. Enquanto *In vivo*, testado em ratinhos, verificou-se aumentos significativos na sobrevivência e com cerca de 20-25% dos ratinhos livres do cancro da mama em 96 dias (GAP31 ou MAP30 a 10 microgramas / por 10 injeções). (Lee-Huang, S. et al. 2000).

3.2.1. Imunotoxinas / Conjugados

Em medicina, as utilizações de RIPs de tipo I não modificadas são bastante limitadas.

A maioria das investigações das RIPs tipo I para usos terapêuticos continua a ser focada na possibilidade de direcioná-las de forma seletiva para células específicas. Concluindo-se que para tal estas teriam que ser ligadas a moléculas (principalmente anticorpos monoclonais, mas também lectinas, hormonas, fatores de crescimento), para formar as denominadas Imunotoxinas ou outros conjugados de ligação celular (Fracasso, G. et al. 2010). As RIPs de tipo II não podem ser utilizadas deste modo, uma vez que as cadeias B ligam-se praticamente a todos os tipos de células, de qualquer forma. Deste modo, as cadeias A separadas (das RIPs II) ou as RIPs de tipo 1 passaram a ser investigadas estando ligadas a AC ou a outros transportadores. (Fiorenzo Stirpe, 2013)

Portanto, as RIPs conjugadas com Anticorpos (AC) para formar Imunotoxinas (IM) podem ser utilizados para identificar os marcadores de superfície cancerígenos e dirigi-las seletivamente para as células alvo.

A maioria dos estudos com o objetivo de eliminar células malignas até à data, obtiveram muito bons resultados, tanto *in vitro* como *in vivo* (Fracasso, G. et al., 2010). Foram também obtidas remissões em alguns ensaios clínicos, mas na maioria dos casos com efeitos secundários controláveis de curta duração. (Akkouh et al., 2015)

Contudo, as IM são proteínas que provocam uma resposta imunológica, deste modo deve-se evitar a administração contínua das mesmas, sendo este o principal obstáculo ao uso de imunotoxinas. Por exemplo: quatro pessoas do sexo feminino com cancro da mama metastático foram tratadas com a imunotoxina 269F9-rRTA. Contudo o ensaio teve que ser rapidamente suspenso uma vez que as doentes tratados com um esquema de perfusão contínua desenvolveram toxicidades neurológicas significativas. Também num outro estudo, cinco pacientes do sexo feminino, com cancro da mama foram tratados com uma imunotoxina em infusão contínua e desenvolveram efeitos tóxicos graves, incluindo sobrecarga de fluido marcante e neuropatias sensório-motoras debilitantes. (Revisão de Fracasso, G. et al., 2010)

Pode-se contornar este problema de duas formas diferentes:

a) Reduzir a imunogenicidade de imunotoxinas, utilizando AC humanos ou humanizados e RIPs modificadas por Pegilação - reação covalente de uma ou mais moléculas de PEG com outra molécula (o PEG liga-se de modo covalente no aminoterminal da proteína) (Meng, Liu, Li, Meng, & Zhao, 2012). Uma imunotoxina preparada com uma Bouganina recombinante modificada (RIP de *Bougainvillea spectabilis*), provocou uma escassa formação de AC quando administrados a animais (Entwistle, Brown, Chooniedass, Cizeau, & MacDonald, 2012). Foi observada uma resposta imunitária limitada em doentes que receberam uma imunotoxina constituída por Gelonina (RIP extraída da planta *Gelonium multiflorum*) recombinante isenta de hidratos de carbono (Borthakur et al., 2013)

b) Administrar imunotoxinas num sector "externo" ao sistema imune: pacientes com câncer de bexiga foram tratados com irrigação intravesical com imunotoxinas construídas com ricina (Zang et al., 2000); obtiveram-se resultados comparáveis com os da quimioterapia local.

A Gelonina e a Saporina, são inibidores extremamente potentes para a síntese de proteínas das células eucarióticas (Puri et al., 2012). Devido ao seu mecanismo de ação repetitivo (inativar irreversivelmente os ribossomas eucarióticos através da clivagem de uma única adenina) e à sua especificidade de substrato, são descritas como tendo capacidade de “matar” uma célula tumoral, uma vez que obtêm acesso aos ribossomas de substrato no citosol (Antignani & FitzGerald, 2013). Considerando este potencial, tanto a Gelonina como a Saporina tornaram-se altamente interessantes e boas candidatas para a sua utilização em terapia genética tóxica. (Min, He, Yang, & Shin, 2016)

A Ricina e Abrina são dois tipos de RIPs tipo II muito potentes (dois exemplos de lectinas), que têm sido intensivamente estudadas devido ao seu interesse médico isto porque podem ser conjugadas com AC e utilizadas como terapia do cancro atuando especificamente nas células cancerígenas. A toxina assim é administrada a uma célula alvo por ligação a um AC ou factor de crescimento que interage especificamente com essa célula. (Samuelsson, Gunnar; Bohlin, Lars; 2010).

Até agora, as imunotoxinas foram administradas apenas a doentes com cancro metastizado, com massas tumorais de elevado tamanho, que com esta terapia conseguiu-se diminuir as mesmas. (F. Stirpe & Battelli, 2006)

As sementes de Saporina S6 (RIP tipo I, extraída da *Saponaria officinalis L.*) têm sido amplamente utilizadas nestes casos devido à sua elevada atividade enzimática, estabilidade e resistência aos processos de conjugação, resultando na morte das células alvo de forma bastante eficaz. (Battelli et al., 2010) Os conjugados à base desta toxina provaram ser eficazes contra linfomas e leucemia, mas os resultados clínicos para o

tratamento de tumores sólidos têm sido bastante decepcionantes. A razão principal é que os conjugados com AC e outros conjugados entram em tumores sólidos de forma fraca e desigual.

Assim, muitas estratégias envolvendo a utilização de fragmentos de anticorpos recombinantes e adjuvantes (por exemplo, saponina) foram investigadas para melhorar a eficácia antitumoral de conjugados (Polito, Bortolotti, Pedrazzi, & Bolognesi, 2011).

CONCLUSÃO

O cancro é hoje um dos maiores desafios da medicina e a procura de novas abordagens terapêuticas para o seu tratamento, não só para melhorar a eficácia de tratamento mas também para melhorar a qualidade de vida dos doentes é uma importante área científica a nível mundial.

Apesar da evolução constante no desenvolvimento de agentes anti-neoplásicos, a resistência à terapêutica convencional representa um dos maiores obstáculos à eficácia do tratamento do cancro no geral e em particular no cancro da mama. Esta resistência acontece muito por mecanismos genéticos e epigenéticos que induzem bloqueio da apoptose.(Bozorgiet al., 2015; Dittmer e Leyh, 2015)

A partir desta dissertação ficou evidente que a apoptose desempenha um importante papel na manutenção e desenvolvimento dos seres vivos eliminando células cancerígenas. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permitiu o desenvolvimento científico em vários aspectos, inclusive o desenvolvimento de novas terapias em geral, e especificamente na utilização de RIPs, contra o cancro.

Os tratamentos convencionais do cancro - quimioterapia e radioterapia - têm como estratégia a indução da morte das células tumorais, provocando alterações no DNA, tais como a inibição da sua síntese, inibição da ação da topoisomerase, formação de ligações cruzadas de DNA. Contudo, como foi referido e demonstrado, nem sempre se consegue realizar este pressuposto e os efeitos secundários são muitas vezes avassaladores.

Assim sendo, a utilização das RIPs torna a terapêutica muito mais eficaz e focalizada para as células cancerígenas, o que torna imperativa a necessidade de continuação futura de investigação nesta área.

É ainda de salientar a aplicação de abordagens de imunoterapia, bem como de terapia genética, através da utilização de células estaminais modificadas por engenharia genética que funcionam como veículo de transporte e libertação de genes terapêuticos, atuando efetivamente no local do tumor primário e das metástases.(Kim et al., 2015; Nahas et al., 2015)

BIBLIOGRAFIA

- Akkouh, O., Ng, T. B., Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Pan, W., Ng, C. C. W., ... Chan, W. Y. (2015). Biological activities of ribosome-inactivating proteins and their possible applications as antimicrobial, anticancer, and anti-pest agents and in neuroscience research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), 9847–9863.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6941-2>
- Antignani, A., & FitzGerald, D. (2013). Immunotoxins: The role of the toxin. *Toxins*, 5(8), 1486–1502. <https://doi.org/10.3390/toxins5081486>
- Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Klaus, S.-O., & Sebastian, W. (1999). Mistletoe Lectin Activates Caspase-8 / FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Mistletoe Lectin Activates Caspase-8 / FLICE Independently of Death Receptor. *Cancer Research*, 59, 2083–2090.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M et al. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.* 505(1), 196–197 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02789-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02789-2)
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Gorini, P., Pession, A., & Stirpe, F. (1996). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly (A). *Biochem. J*, 319(3), 507–513. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217797/pdf/8912688.pdf>
- Battelli, M. G., Scicchitano, V., Polito, L., Farini, V., Barbieri, L., & Bolognesi, A. (2010). Binding and intracellular routing of the plant-toxic lectins, lanceolin and stenodactylin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(12), 1276–1282.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.09.006>
- Blagosklonny, M. V. (2011). The power of chemotherapeutic engineering: Arresting cell cycle and suppressing senescence to protect from mitotic inhibitors. *Cell Cycle*, 10(14), 2295–2298. <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16819>
- Bolognesi, A., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M. G., & Polito, L. (2016). Ribosome-Inactivating Proteins from Plants : A Historical Overview.
<https://doi.org/10.3390/molecules21121627>
- Bonifacino, J. S., & Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(8), 568–579.
<https://doi.org/10.1038/nrm1985>
- Borthakur, G., Rosenblum, M. G., Talpaz, M., Daver, N., Ravandi, F., Faderl, S., ... Cortes, J. E. (2013). Phase 1 study of an anti-CD33 immunotoxin, humanized monoclonal antibody M195 conjugated to recombinant gelonin (HUM-195/rGEL), in

- patients with advanced myeloid malignancies. *Haematologica*, 98(2), 217–221.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2012.071092>
- Bozorgi, A. et al. - New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. *J Breast Cancer*. 18:4 (2015) 303–312.
- Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P. G., Guidarelli, A., ... Sperti, S. (2002). Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(3), 365–72. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0521com>
- Cai, Y.; Xiong, S.; Zheng, Y.; Luo, F.; Jiang, P.; Chu, Y. (2011) Trichosanthin enhances anti-tumor immune response in a murine lewis lung cancer model by boosting the interaction between TSLC1 and CRTAM. *Cell. Mol. Immunol.*
<https://doi.org/10.1038/cmi.2011.12>
- Carneiro, R., Barbedo, I., Costa, I., Reis, E., Rocha, N., & Gonçalves, E. (2011). Estudo comparativo dos cuidados prestados a doentes nos últimos dias de vida: Num Serviço de Medicina Interna e Numa Unidade de Cuidados Paliativos. *Acta Medica Portuguesa*, 24(4), 545–554. <https://doi.org/22521012>
- Citores L, Ferreras JM, Muñoz R, Benítez J, Jiménez P, Gírbés T (2002) Targeting cancer cells with transferrin conjugates containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins nigrin b or ebulin I. *Cancer Lett* 184(1):29–35. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00169-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00169-6)
- Chen, Y.; Zhang, M.; Jin, H.; Tang, Y.; Wu, A.; Xu, Q.; Huang, Y. (2017) Prodrug-like, PEGylated protein toxin trichosanthin for reversal of chemoresistance. *Mol. Pharm.*
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00987>
- Cheung MC, Revers L, Perampalam S et al. (2010) An evolved ribosome-inactivating protein targets and kills human melanoma cells in vitro and in vivo. *Mol. Cancer* 9, 28.
<https://doi.org/10.1186/1474-2859-9-28>
- Das, M. K., Sharma, R. S., & Mishra, V. (2012). Induction of Apoptosis by Ribosome Inactivating Proteins, 1552–1561. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9550-x>
- De Virgilio, M. . et al. (2010). Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack, 2699–2737. <https://doi.org/10.3390/toxins2112699>
- De Zaeytijd J, Van Damme EJ (2017) Extensive evolution of cereal ribosome-inactivating proteins translates into unique structural features, activation mechanisms, and physiological roles. *Toxins (Basel)* 9(4):E123. <https://doi.org/10.3390/toxins9040123>
- Endo, Y., & Tsurugi, K. (1988). The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with

- rRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 263(18), 8735–8739.
- Entwistle, J., Brown, J. G., Chooniedass, S., Cizeau, J., & MacDonald, G. C. (2012). Preclinical Evaluation of VB6-845: An Anti-EpCAM Immunotoxin with Reduced Immunogenic Potential. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 27(9), 582–592. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1200.271>
- Fabbrini MS, Katayama M, Nakase I, Vago R (2017) Plant ribosome inactivating proteins: rogresses, challenges and biotechnological applications (and a few digressions). *Toxins (Basel)* 9(10):E314. <https://doi.org/10.3390/toxins9100314>
- Falnes PO, Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12(4), 407–413 (2000). [https://doi:10.1016/s0955-0674\(00\)00109-5](https://doi:10.1016/s0955-0674(00)00109-5)
- Genuth N.R., Barna M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol. Cell.* 2018;71:364–374. <http://doi:10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Gilles, A.; Frechin, L.; et all. Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies (2020). *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9030629>
- Harmsma, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tusenius, K. J., & Ramaekers, F. C. S. (2006). Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 56(6 A), 474–482. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296815>
- Henriksen, K., Kulmala, J., Toppari, J., Mehrotra, K., & Parvinen, M. (1996). Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *Journal of Andrology*, 17(4), 394–402.
- Iglesias, R., Citores, L., Ragucci, S., Russo, R., Di Maro, A., & Ferreras, J. M. (2016). Biological and antipathogenic activities of ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(6), 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.011>
- Kang, M.; Ou, H.; Wang, R.; Liu, W.; Mao, Y.; Tang, A. (2013) Effect of trichosanthin on apoptosis and telomerase activity of nasopharyngeal carcinomas in nude mice. *JBUON* 2013; 18(3): 676
- KIM, Y. et al. - Gene therapy strategies using engineered stem cells for treating gynecologic and breast cancer patients (Review). *Oncol Rep.* 33 (2015) 2107–2112.
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2001). First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 271–80. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2506>

- Leist, M., & Jäättelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(8), 589–598.
<https://doi.org/10.1038/35085008>
- Marvibaigi, M., Supriyanto, E., Amini, N., Abdul Majid, F. A., & Jaganathan, S. K. (2014). Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/785479>
- Meng, Y., Liu, S., Li, J., Meng, Y., & Zhao, X. (2012). Preparation of an antitumor and antiviral agent: Chemical modification of α -MMC and MAP30 from *Momordica Charantia* L. with covalent conjugation of polyethylene glycol. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3133–3142. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30631>
- Min, K. A., He, H., Yang, V. C., & Shin, M. C. (2016). Construction and characterization of gelonin and saporin plasmids for toxic gene-based cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research*, 39(5), 677–686. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0739-3>
- Olsnes, S. (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44(4), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.003>
- Pizzo, E., & Di Maro, A. (2016). A new age for biomedical applications of Ribosome Inactivating Proteins (RIPs): from bioconjugate to nanoconstructs. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0272-1>
- Peumans WJ, Van Damme EJM. Evolution of plant ribosome-inactivating proteins. In: Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs 18. Lord JM, Hartley MR (Eds). SpringerVerlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1–26 (2010).
- Polito, L., Bortolotti, M., Pedrazzi, M., & Bolognesi, A. (2011). Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins*, 3(6), 697–720. <https://doi.org/10.3390/toxins3060697>
- Pryme, I. F., Bardocz, S., Pusztai, A., & Ewen, S. W. B. (2006). Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins. *Histology and Histopathology*, 21(1–3), 285–299.
- Puri, M., Kaur, I., Perugini, M. A., & Gupta, R. C. (2012). Ribosome-inactivating proteins: Current status and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 17(13–14), 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.007>
- Quintas, A., Freire, A., Halpern, . (2008). Bioquímica: Organização molecular da Vida. Lidel (729-733). Lisboa.
- Reisbig R, Olsnes S, Eiklid K. (1981) The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256(16), 8739–8744
- Roberts R.B. (1958) Microsomal Particles and Protein Synthesis. Pergamon Press;

- New York, NY, USA: Introduction.
- Sha, O., Niu, J., Ng, T. B., Cho, E. Y. P., Fu, X., & Jiang, W. (2013). Anti-tumor action of trichosanthin, a type 1 ribosome-inactivating protein, employed in traditional Chinese medicine: A mini review. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(6), 1387–1393. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2096-y>
- Shaw, P. C., Lee, K. M., & Wong, K. B. (2005). Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties. *Toxicon*, 45(6), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.024>
- Sinha Hikim, A. P., & Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, 4(1), 38–47. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040038>
- Sowa-Rogozinska, N., Sominka, H., Nowakowska-Gotacka, J., Sandving K., Stomunska-Wojewodzka, M. (2019). Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin. *Toxins*. PMID: 31216687. <https://doi.org/10.3390/toxins11060350>
- Stirpe, F. (2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*, 67, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.005>
- Stirpe, F., & Battelli, M. G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: Progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(16), 1850–1866. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6078-7>
- Vago, R., Marsden, C. J., Lord, J. M., Ippoliti, R., Flavell, D. J., Flavell, S. U., ... Fabbrini, M. S. (2005). Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. *FEBS Journal*, 272(19), 4983–4995. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04908.x>
- Voss, C., Eyol, E., & Berger, M. R. (2006). Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211(3), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.016>
- Wei-Wei, Shi; Kam-Bo, Wong; Pang-Chui, Shaw. (2018) Structural and Functional Investigation and Pharmacological Mechanism of Trichosanthin, a Type 1 Ribosome-Inactivating Protein. <https://doi.org/10.3390/toxins10080335>
- Yamasaki, C., Nishikawa, K., Zeng, X. T., Katayama, Y., Natori, Y., Komatsu, N., Natori, Y. (2004). Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1671(1–3), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.01.002>
- Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Shimazaki, K. I., Song, S. K., Lee, K. H., ... Kim, J. B. (1999). Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce

apoptosis in tumor cells. *Cancer Letters*, 136(1), 33–40.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00300-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00300-0)

Zeng, M., Zheng, M., Lu, D., Wang, J., Jiang, W., & Sha, O. (2015). Anti-tumor activities and apoptotic mechanism of ribosome-inactivating proteins. *Chinese Journal of Cancer*, 34(3), 30. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0030-x>

WEBGRAFIA

American Cancer Society (2018). Acedido a 25/07/2017.

<https://www.cancer.org/cancer/breast-canc//er/treatment.html>.

Ana Luísa de Oliveira e Garcia Ricardo (2007). Expressão da Caspase-3 Activada no Epitélio Germinal de Pacientes com Azoospermia Obstrutiva. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

<https://ria.ua.pt/bitstream/10773/715/1/2007001270.pdf>

Cancer Research UK (2018). Acedido a 28/07/2020.

<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence#heading-Zero>

Cancro na Família (2020). Acedido a 25/07/2020.

<http://www.cancronafamilia.com/pt/biologia-do-cancro/carcinogenese/>

Direcção-Geral da Saúde (2020). Acedido a 28/07/2020

<https://www.dgs.pt/saude-publica1/amianto.aspx>

EMA. European Medicines Agency (2017). Acedido a 25/05/2017.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002050/WC500145307.pdf .

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Acedido a 05/05/2017

<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-One>.

IARC (2012), World Health Organization. Acedido a 05/05/2017

<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0> ,

IARC (2012), World Health Organization. Acedido a 16/02/2017.

<http://gco.iarc.fr/today/home>

IARC (2016), World Health Organization. Acedido a 28/07/2020

<https://cancer-code-europe.iarc.fr/index.php/pt/12-formas/tabaco/1407-o-consumo-de-tabaco-provoca-cancro-que-percentagem-de-cancro-e-provocada-pelo-tabagismo>

IARC (2018), World Health Organization. Acedido a 06/03/2020.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/40-All-cancers-excluding-non-melanoma-skin-cancer-fact-sheet.pdf>

Liga Portuguesa Contra o Cancro (2020). Acedido a 20/03/2020:

<https://www.ligacontracancro.pt/factores-de-risco/>

Matos, C., D. (2008). Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomas extraídas de plantas. Tese apresentada à faculdades de Ciências farmaceuticas da universidade estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de mestre, orientada por Prof.Dra Iracilda Zeppone Carlos, Araraquara. Acedido a 20/02/2017
http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/93611/matos_dc_me_arafcf.pdf?sequence=1.

Nacional cancer Institute, 2015. Acedido a 05/04/2020
<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>

Nacional cancer Institute, 2015. Acedido a 05/05/2017
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.

Organização Mundial de Saúde (2017). Acedido a 16/03/2020. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1

Serviço Nacional de Saúde (2016). Acedido a 03/03/2020.
<https://www.sns.gov.pt/noticias/2018/02/02/dados-do-cancro-em-portugal/>

Silva, Filipa S. (2013). Harvard medical school Portugal. Acedido a 05/05/2019.
<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer#heading-One>

BIBLIOGRAFIA ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS E TABELAS

American Cancer Society. 1.800.227.2345. Acedido a 09/10/2018

<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf>

Cancer Journal Research and therapeutics. Acedido a 03/05/2017.

http://www.cancerjournal.net/articles/2014/10/4/images/JCanResTher_2014_10_4_846_139264_f1.jpg

Cancer Research UK. Acedido a 28/07/2020.

<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer>

Cancro na Família. Acedido a 28/06/2020

<https://www.cancronafamilia.org/pt/cancro-da-mama/detect-diagnose/diagnose/imaging-tests>

Cheriyedath, Susha (2018); News Medical Life Sciencies. Acedido a 28/03/2018

<http://www.news-medical.net/life-sciences/Regulation-of-Gene-Expression.aspx>

Human Diseases and Conditions. Acedido a 09/05/2017.

<http://www.humanillnesses.com/original/At-Ca/Breast-Cancer.html>

IARC (2018), World Health Organization. Acedido a 06/04/2020.

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode_population=who&population=250&populations=250&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=1&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=all&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=2&population1=250&population2=554&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_list=12,24,204,72,854,108,132,120,140,148,174,180,178,384,262,818,226,232,748,231,638,266,288,324,624,404,426,430,434,450,454,466,478,480,504,508,516,562,566,646,678,686,694,706,710,728,729,834,270,768,788,800,732,894,716&population_group_globocan_id=903&type_sort=0

IARC (2018), World Health Organization. Acedido a 06/04/2020

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D

IARC (2018), World Health Organization. Acedido a 06/04/2020.

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D

IARC (2018), World Health Organization. Acedido a 06/04/2020.

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=

Ophardt, Charles (2003); Virtual Chembook. Elmhurst College. Acedido a 16/02/2017

<http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/584proteinsyn.html>

Ricardo, Ana Luisa (2007). Universidade de Aveiro. Acedido a 08/10/2017.

<https://ria.ua.pt/bitstream/10773/715/1/2007001270.pdf>

Santos, Helivania (2020); Biologia Net. Acedido a 25/07/2020

<https://www.biologianet.com/biologia-celular/sintese-proteica.htm>