

Proteínas Inovadoras de Ribossomos: um Veneno Vegetal com Aplicações Farmacológicas - Características Físico-químicas, Estruturais e Biológicas

Daniel M. Mota¹
Lieselotte R. Bomfim²
Socorro Vanesca F. Madeira³
Márcio Viana Ramos⁴

1 Professor Mestre do
Departamento de
Farmácia da
Universidade Federal
do Ceará

2 e 3 Estudantes de
Iniciação Científica do
CNPq do Laboratório
de Lectinas da
Universidade Federal
do Ceará.

4 Professor Doutor do
Departamento de
Biologia da
Universidade Federal
do Ceará.

RESUMO

Proteínas inativadoras de ribossomos formam uma classe de moléculas altamente tóxicas, as quais matam, especificamente, células através de uma ação enzimática sobre a subunidade ribossomal 60S na posição A_{432} . Estas proteínas estão agrupadas como RIPs tipo I (compostas por uma única cadeia polipeptídica com atividade enzimática) e tipo II (compostas por uma cadeia polipeptídica com atividade enzimática, covalentemente ligada a uma cadeia polipeptídica com atividade lectínica). O mecanismo de ação das RIPs tem sido extensivamente estudado e seus efeitos tóxicos determinados. Embora a potencialidade tóxica destas proteínas seja admirável, as RIPs também têm sido exploradas na construção química de poderosas drogas para serem usadas como mísseis biológicos no tratamento clínico de doenças humanas.

Palavras-chave: Toxinas vegetais, RIPs, imunotoxinas

ABSTRACT

Ribosome inactivating proteins form a class of highly toxic molecules which specifically kill cell by their N-glycosidase enzymatic activity under the 60S ribosomal subunit at A_{432} position. These proteins are grouped as type I RIPs (composed by a single enzymatic polypeptide chain, A) and type II (composed by a enzymatic polypeptide chain A, covalently linked to a polypeptide lectin chain, B). The mechanism of action from RIPs has been extensively studied and the toxic effects investigated. Although their pontence to kill cells be remarkable, the RIPs have been exploted in the chemical construction of powerfull drugs to be used as biological missile in the clinical treatment of human deseases.

Key words: Plant toxins, RIPs, Immunotoxins

INTRODUÇÃO

As proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) de plantas constituem um grupo de enzimas RNAr N-glicosidases, que inibem a síntese proteica por agir removendo, com especificidade, uma adenina universalmente conservada na posição A₄₃₂₄ de ribossomos de ratos (Stirpe & Barbieri, 1986). Elas podem ser classificadas dentro de dois grupos: as RIPs tipo I, que apresentam uma única cadeia polipeptídica (A) e as RIPs tipo II, que são compostas de duas cadeias polipeptídicas distintas (AB). Uma nova classificação para essas proteínas foi recentemente proposta, de acordo com a sua estrutura molecular (Cítores et al., 1993). No entanto, as RIPs de quatro cadeias, propostas por autores, são consideradas RIPs especiais do tipo II, compostas de dois dímeros, sendo que cada um possui duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (Barbieri et al., 1993; Van Damme et al., 1996). Recentemente, Barbieri et al (1997) demonstraram que as RIPs tipo I e II são capazes de depurar substratos que contenham a base nitrogenada adenina (DNA, RNA e polinucleotídeos de adenina). Estes dados sugerem, que estas proteínas podem ser classificadas como polinucleotídeo adenosinas glicosidases.

A complexa estrutura molecular e toxicidade das RIPs estimulou a investigação destas proteínas como modelo para o entendimento dos mecanismos de translocação de substâncias através da membrana plasmática e seu posterior destino no citoplasma celular. Além disto, o entendimento do mecanismo de toxicidade das RIPs, associado à especificidade dos anticorpos, levou ao surgimento de um novo campo da investigação científica na construção de drogas de alta potencialidade e especificidade.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A massa molecular das RIPs tem usualmente sido examinada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS). As

massas moleculares das RIPs variam em torno de 30 kDa, tanto para as RIPs tipo I como para a cadeia A das RIPs tipo II. Valores um pouco superiores a estes, são encontrados para a cadeia B das RIPs tipo II. A composição de aminoácidos é conhecida para um número variável de RIPs de ambos os tipos. As RIPs tipo I gelonina, inibidor de *Momordica charantia* e diantina, apresentaram diferenças quanto a composição de aminoácidos (Falaska et al., 1982). O inibidor de *Momordica charantia* contém baixo teor de lisina. Resíduos de cistina e metionina são mais abundantes em diantina 30 e 32, que têm uma composição de aminoácidos bastante similar. As RIPs tipo II são, em geral, ricas em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos semelhantes às lectinas vegetais, contendo também, aminoácidos sulfurados, como é o caso das RIPs presentes nas sementes de *Abrus precatorius* (Hermann & Behnke, 1981).

A grande maioria das RIPs são glicoproteínas. As cadeias glicanas ligadas covalentemente à porção proteica não têm um papel relevante na atividade enzimática das RIPs, pois esta atividade está presente em algumas proteínas não glicosiladas e produzidas em bactérias, como a cadeia A da abrina. Entretanto, esses carboidratos apresentam uma grande importância no processo de penetração destas proteínas no citoplasma. A porção glicídica das diferentes RIPs varia tanto em quantidade como na composição de açúcar (Barbieri et al., 1993). A gelonina e a cadeia A da ricina podem ser parcialmente deglicosiladas sem afetar a capacidade de inibir a síntese proteica em reticulócitos lisados de coelho. A cadeia A recombinante da ricina, não glicosilada, produzida em *Escherichia coli* é completamente funcional.

A seqüência completa de aminoácidos de várias RIPs já foi determinada. A análise comparativa das seqüências estudadas mostra que estas proteínas guardam um grau de homologia que varia entre 18 e 63% (Montecucchi et al., 1989).

Três regiões, envolvidas na atividade enzimática, foram identificadas por

mutagênese direcionada ao sítio ativo proposto para a ricina (Montfort et al., 1987). Embora resultados conflitantes tenham sido publicados a esse respeito (Sundan et al., 1989), vários resíduos parecem importantes para a ação catalítica da cadeia A da ricina. Assim, variação nos resíduos de aminoácidos Tyr80-Phe, Tyr123-Phe, Glu177-Gln e Arg180-His provoca redução substancial na atividade. Variações nos resíduos Tyr72-Phe e Tyr118-Phe na proteína antiviral de *Mirabilis charantia* promovem redução acentuada na atividade inibitória da tradução proteica apenas em ribossomos de *E.coli*. Essa mesma variação, na cadeia A da ricina, favorece a redução na atividade contra ribossomos de mamíferos (Ready et al., 1991). Esses resultados sugerem que as RIPs podem existir em diferentes isoformas na mesma planta, e que as diferenças observadas nas seqüências não são devidas a alteração no anelamento mas, sim por existirem seqüências nucleotídicas diferentes. Poucos dados ainda avaliados indicam que a cadeia B das RIPs tipo II apresenta também seqüências de aminoácidos similares. Kimura e colaboradores (1993) determinaram a seqüência completa de aminoácidos da cadeia B das isoformas da abrina-a e abrina-b presentes nas sementes de *Abrus precatorius*. A cadeia B da abrina-a e da abrina-b consistem de 268 resíduos de aminoácidos, sendo que 256 deles são idênticos. Comparando a seqüência dessas isoformas da abrina com a cadeia B da ricina, o grau de homologia aproxima-se de 60 %.

ESTRUTURA MOLECULAR

As RIPs podem ser divididas dentro de duas classes, de acordo com a presença ou ausência de uma cadeia polipeptídica contendo sítios de interação para carboidratos. As RIPs tipo I formam um grupo de proteínas intimamente relacionadas. As RIPs tipo II são compostas de duas ou quatro cadeias polipeptídicas e suas estruturas quaternárias apresentam massas moleculares aparentes variando em torno de 60 e 136 kDa. As duas cadeias polipeptídicas são ligadas por ponte dissulfeto e outras

ligações não covalentes (Lewis & Youle, 1986). A abrina, modicina, ricina, volkensina e pulchelinas são heterodímeros compostos de uma cadeia A e uma cadeia B (Citores et al., 1993; Ramos, 1993; Mota, 1997). A cadeia B está diretamente implicada no processo de adesão e internalização celular, enquanto que a cadeia A está relacionada com a inativação dos ribossomos através de sua atividade enzimática.

A cadeia A é um polipeptídeo globular que apresenta uma estrutura secundária regular e uma fenda bem definida. Essa fenda parece estar envolvida com a atividade enzimática ou forma sua base estrutural, pois a atividade da ricina recombinante é abolida por modificações introduzidas na seqüência de nucleotídeos, na posição correspondente aos aminoácidos envolvidos nesta região (Montfort et al. 1987). A cadeia B é produto de uma duplicação de gens, mostrando 32 % de aminoácidos idênticos entre as duas partes da cadeia polipeptídica (Villafranca & Robertus, 1981). Os resultados de difração de raio-x mostram que a cadeia B é dividida em dois domínios estruturais similares contendo um sítio de ligação para lactose na fenda superficial. A especificidade epimérica da ligação à galactose é dada por uma ponte de hidrogênio entre um resíduo de glutamina e um grupo hidroxila na posição quatro do carboidrato. Os dados obtidos através de estudos de difração de raio-x confirmam também a evidência bioquímica de que as duas cadeias são ligadas por pontes dissulfeto e por ligações hidrofóbicas.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O efeito direto das RIPs tipo I e II sobre a função e a estrutura celular é devido a um dano irreversível aos ribossomos, os quais tornam-se incapazes de ligação a um fator de alongação, com a conseqüente inibição da síntese proteica. As proteínas de ambos os tipos apresentam similaridades de potência em sistemas livres de células, mas existem diferenças de toxicidade para células e animais. As RIPs tipo II podem ser 100 vezes mais potentes que as RIPs tipo I ao inibir a síntese proteica em culturas de células. Essa

diferença é devido a presença, nas RIPs tipo II, da cadeia B com atividade lectínica, que liga-se a superfície celular, sinalizando a entrada na célula (Barbieri et al., 1993). Esses danos funcionais são uma consequência de modificações do RNAr como demonstrado por Endo e colaboradores (1988; 1991), quando encontraram que as RIPs tipo I e a cadeia A das RIPs tipo II possuem uma atividade RNA-N-glicosidase singular, que cliva a ligação N-glicosídica da A₄₃₂₄ do RNAr 28S de células eucarióticas de mamíferos (Endo & Tsurugi, 1987; Endo et al. 1987). Essa base nitrogenada situa-se próxima ao sítio de clivagem do RNAr para um grupo de RNAses altamente específicas isoladas de fungos: (α -sarcina de *Aspergillus giganteus*, restrictocina e mitogillino de *Aspergillus restrictus* que clivam a ligação fosfodiéster entre a G₄₃₂₅ e A₄₃₂₆ do RNAr do fígado de ratos (Fong et al., 1991). Todos os resíduos de adenina clivados estão localizados em uma hélice seqüencial do RNAr que possui a seqüência GAGA, a qual sugere que as RIPs reconheçam essa estrutura de forma específica (Barbieri et al., 1993).

A ricina não afeta, de modo significativo, a síntese proteica de ribossomos bacterianos ou mitocondriais (Lugnier et al., 1976) e consistentemente, a ricina não depurina, por completo, RNAr de *E. coli*. Dessa maneira, genes que codificam para ricina podem ser expressos em *E. coli* (O'hare et al., 1987).

O mecanismo de entrada nas células, de proteínas tóxicas que agem sobre sítios intracelulares, foi objeto de muitos estudos nos anos recentes, entretanto os resultados não são conclusivos. O interesse no mecanismo de internalização de toxinas aumentou devido esse mecanismo ser um ponto chave na possível utilização terapêutica dessas proteínas ou de seus derivados e por esses estudos darem importante discernimento no transporte intracelular e na distribuição de ligantes fisiológicos. Muitas evidências sugerem que essas toxinas entram e distribuem-se nas células por vias específicas utilizadas por outras moléculas fisiológicas.

A maioria dessas observações está voltada para as RIPs tipo I. Os resultados

publicados sugerem que mais de um mecanismo de internalização esteja envolvido. A interação célula-RIP mostra regras comuns: (1) a inibição da síntese proteica não pode ser detectada nas células antes de 30 minutos (Sandvig et al., 1976); (2) somente poucas moléculas tóxicas são captadas pelas células e transferidas para o citosol, alcançando assim o seu alvo (Sandvig et al., 1986); e (3) uma única molécula RIP pode ser suficiente para induzir a morte celular (Eiklid et al., 1980).

O primeiro passo na internalização das RIPs é a interação RIP-célula que consiste na ligação dessas proteínas a sítios receptores na membrana celular. Esse processo pode ocorrer em temperatura fisiológica ou a 0 °C e ser abolido por adição de galactose (Nicolson et al., 1974) ou ilimaquinona (Nambiar & Wu, 1995), um metabólito obtido de esponjas do mar.

As RIPs de duas cadeias interagem especificamente com galactose. Elas são potentes toxinas captadas por um número maior de células, devido à presença de glicolipídios e glicoproteínas na superfície de todos os tipos de células. A adição de galactose e lactose *in vitro* promove uma competição com os receptores de membrana pela toxina, inibindo a ligação na membrana celular e reduzindo drasticamente a toxicidade (Olsnes et al., 1974).

Outro processo de reconhecimento está no envolvimento da interação de receptores celulares com as cadeias laterais de carboidratos da toxina. As cadeias A e B da ricina apresentam grupos de oligossacarídeos contendo manose, os quais são os principais responsáveis pela captação e toxicidade da toxina em células não parenquimais do fígado de ratos (Magnusson et al., 1991). A captação da ricina por essas células é afetada por galactose, porém inibida com mais eficiência por manose, sendo completamente abolida na presença de ambos carboidratos (Magnusson et al., 1993). Isso indica que a ricina liga-se e é captada por células não parenquimais através de dois mecanismos distintos: via reconhecimento específico de receptores na membrana plasmática mediado pela cadeia B ou através

do reconhecimento das cadeias glicanas da toxina por ligantes presentes na membrana celular. O elevado efeito inibitório de manose sobre a citotoxicidade da ricina sugere que o segundo mecanismo é mais eficiente. Entretanto, a ricina invade o citoplasma de hepatócitos de ratos através de sua atividade lectínica (Barbieri et al., 1993).

O mecanismo de entrada das RIPs tipo I não é bem conhecido e somente hipóteses foram formuladas. Resultados obtidos com a gelonina sugerem que o mecanismo de reconhecimento da porção glicosilada da toxina por receptores de manose da membrana media a entrada da toxina no citoplasma. Entretanto, a presença de manana não inibe completamente a toxicidade da gelonina (Madan & Ghosh, 1992). A saporina-S6, uma RIP tipo I não glicosilada, é mais tóxica para muitos tipos de células, comparada às outras do tipo I que são glicoproteínas (Barbieri et al., 1993).

A abrina e a ricina ligam-se a uma variedade de diferentes moléculas de superfície celular (Simmons et al., 1986) podendo seguir várias rotas intracelulares, uma das quais permite a transferência da toxina ao citosol. Como as células não parenquimais do fígado, os macrófagos também captam a ricina tanto via receptores contendo galactose quanto por receptores de manose. Esse último parece envolver um mecanismo mais eficiente, pois a toxicidade para macrófagos deve-se principalmente à captação por receptores de manose, embora a quantidade de ricina captada pelos macrófagos via estruturas da superfície celular para galactose seja maior, comparada àquela de manose (Simmons et al., 1986).

A redução das pontes dissulfetos intercadeia das RIPs tipo II diminui a toxicidade para as células. Whight & Robertus (1987) demonstraram que a alcalinização dos resíduos de cisteína envolvidos com a ligação das cadeias A e B da ricina, sem romper a associação das subunidades, anula completamente a citotoxicidade e diminui sua habilidade de ligar-se em células HeLa ou inativar ribossomos *in vitro*. As pontes dissulfeto parecem exercer um papel em outro passo do processo de intoxicação.

O efeito dessas toxinas sobre a síntese proteica *in vivo* ocorre paralelamente com lesões ultra-estruturais. Assim, a inibição da síntese proteica foi verificada no baço, fígado e pâncreas de ratos envenenados com a ricina, modicina (Sperti et al., 1979) e abrina. Verificou-se que em ratos envenenados com a modicina o comprometimento da síntese proteica foi acompanhado por danos à subunidade ribossomal 60S. A cadeia A das toxinas tem a mesma atividade N-glicosidase, no entanto, diferentes lesões observadas *in vivo* são provavelmente devido os diferentes caminhos das toxinas nas células. Essas lesões causadas pelas RIPs tipo II são bastante diferentes daquelas observadas em animais mortos com outros inibidores da síntese proteica (Barbieri et al., 1993). A ricina induz a produção de fator de necrose tumoral e interleucinas em células mononucleares do sangue periférico humano, em tempo e dose dependentes. A contribuição dessas citocinas nas lesões causadas por essas toxinas é ainda desconhecida, entretanto, elas podem provocar febre em animais envenenados pela ricina (Licastro et al. 1993).

A elevada toxicidade das RIPs tipo I para macrófagos direciona os estudos, em relação a essas proteínas, para uma possível atividade imunossupressora. De fato, momordina I, PAP-S e gelonina inibem a formação de anticorpos em resposta a antígenos T-dependentes, retardando o processo de rejeição de enxerto de pele e diminuindo a resistência a enxertos de tumores alogênicos. Entretanto, todos esses efeitos ocorrem somente se as RIPs forem administradas em camundongos algum tempo antes, e não juntamente, ou depois da inoculação do antígeno (Descotes et al., 1985).

Remédios preparados com raízes de tubérculo de *Trichosanthes kirilowii*, uma *Cucurbitaceae*, foram usados na medicina popular por muitos anos pelos chineses para causar aborto. Uma vasta literatura, principalmente de cientistas da China, existe sobre essa atividade (Barbieri et al., 1993). O princípio ativo responsável pela atividade abortifaciente foi purificado e identificado como sendo uma proteína (tricosantina) a

qual induz aborto em camundongos, coelhos e macacos, mas não em ratos e hamsters. Várias outras RIPs testadas apresentaram atividade abortifaciente similar em camundongos (Yeung et al., 1988).

Os efeitos da tricosantina sobre a fertilidade foram detalhadamente estudados: (1) causa necrose seletiva sobre o sincitrotrofoblasto placentário; (2) a formação de coágulos na circulação local induz mudanças na área infartada e (3) essas mudanças são acompanhadas por prejuízos das atividades funcionais, como diminuição do hormônio gonadotrofina coriônica humano e dos níveis de hormônios esteróides, danos causados às trocas metabólicas e aumento na síntese de prostaglandinas com a conseqüente indução do aborto. Esses efeitos são provavelmente devidos a alta toxicidade das RIPs para células de corioncarcinomas e trofoblastos, a qual é consistente com a alta atividade pinocítica dessas células (Barbieri et al., 1993).

Substâncias carreadoras, as quais podem transportar as RIPs tipo I para dentro das células inclui: lipossomas (McIntosh & Heath, 1982), eritrócitos fantasmas (Foxwell et al., 1984) e envelope viral (Sargicuomo et al., 1983), os quais todos podem liberar seu conteúdo dentro do citoplasma celular.

CONSTRUÇÃO DE IMUNOTOXINAS

Com o intuito de construir mísseis biológicos, várias drogas ou moléculas tóxicas têm sido ligadas covalentemente a carreadores que especificamente reconhecem células alvo. Uma variedade de moléculas foi usada para construção destes mísseis biológicos. Os anticorpos monoclonais são os mais freqüentemente usados como carreadores, mas também lectinas, hormônios, fatores de crescimento, receptores, substâncias ligantes de receptores e antígenos foram explorados.

As proteínas inativadoras de ribossomos podem ser ligadas quimicamente a anticorpos para formar moléculas híbridas chamadas de imunotoxinas, direcionadas às células alvo do anticorpo usado. A ligação intermolecular entre anticorpo e toxina é feita por uma ligação dissulfeto, e menos

freqüentemente por ligações tioéteres (Barbieri et al., 1993). As imunotoxinas não inibem a síntese proteica em sistemas livres de células, a menos que essa ligação seja rompida por redução.

As imunotoxinas têm sido preparadas com ambos os tipos de RIPs. A toxina mais empregada com esse propósito é a ricina, inicialmente usada na sua forma nativa. Contudo, preparações de conjugados com a ricina apresentam baixa especificidade, devido à cadeia B da ricina ligar-se a A, e conseqüentemente ser englobada por milhares de células. Melhores resultados foram obtidos conjugando-se apenas a cadeia A ao anticorpo. Nesse caso, a especificidade do anticorpo usado é que facilitará a entrada da toxina na célula. As maiores desvantagens do uso da cadeia A da ricina, bem como de outras toxinas de duas cadeias, são as preparações complexas e perigosas envolvendo alguns reagentes. Isso, no entanto, poderá ser facilitado com o uso da cadeia A recombinante, considerando-se que no futuro próximo, a molécula inteira imunotóxica venha a ser produzida por técnicas de biologia molecular.

A preparação de imunotoxinas com a cadeia A da abrina (Hwang et al., 1984) e da viscumina foi pouco investigada, provavelmente porque essas toxinas foram menos estudadas quanto aos aspectos químicos e estruturais, comparadas à ricina. Recentemente, Tonevitsky et al. (1996), demonstraram que imunotoxinas construídas com anticorpos monoclonais anti-CD25 e a cadeia A da lectina mistletoe I (*Viscum album*) são bem mais ativas quando comparadas às imunotoxinas contendo apenas a cadeia A da ricina. As preparações de imunotoxina com RIPs tipo I parecem oferecer algumas vantagens: a cadeia é mais estável, fácil e segura de preparar, além de que algumas imunotoxinas contendo saporina-S6 parecem mais potentes comparadas às imunotoxinas construídas com o mesmo anticorpo e utilizando a cadeia A da ricina (Siena et al., 1988). Isso é possível devido ao fato de a imunotoxina saporina ser mais facilmente captada pelas células alvo ou seguir uma via intracelular diferente, da qual ela escape do processo de inativação. Essas observações sugerem que a entrada nas células e/ou a

via intracelular seguida pelas imunotoxinas podem ser diferentes ou condicionadas pelo tipo de RIP usada.

As imunotoxinas contendo RIPs tipo I têm uma alta toxicidade para animais, comparadas às RIPs livres (Battelli et al., 1990). Pelo menos em parte, a alta toxicidade das imunotoxinas é devido o maior tamanho dessas moléculas, o que previne sua excreção através dos rins.

O primeiro conjugado com uma RIP tipo I foi preparado por ligação da gelonina com a Concanavalina A (Stirpe et al., 1980). Recentemente a cadeia A da ricina foi ligada ao antígeno CD4 como arma na eliminação de células infectadas por HIV (Zarling et al., 1990). As RIPs ligadas a antígenos responsáveis por doenças auto-imune são potencialmente usadas em terapia (Barbieri et al., 1993). Obviamente, um pré-requisito para assegurar o uso de imunotoxinas é a utilização de anticorpos específicos para as células alvo.

O avanço das pesquisas direcionadas ao entendimento do caminho seguido pelas RIPs dentro do citoplasma, associado ao estudo químico da construção de imunotoxinas poderá, nos próximos anos, culminar com o uso de imunotoxinas no tratamento para eliminar, especificamente, populações de células doentes ou indesejadas presentes em tecidos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBIERI, L., BATTELLI, M.G., STIRPE, F. **Ribosome-inactivating proteins from plants**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1154, p.237-282, 1993.

BARBIERI, L., VALBONESI, P., BONORA, E., GORINE, P., BOLOGNESI, A. & STIRPE, F. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A). *Nucleic. Acids Res.*, v.25, n.3, p.518-522, 1997.

BATTELLI, M.G., BARBIERI, L., STIRPE, F. **Toxicity of, and Histological Lesions caused by, Ribosome-Inactivating**

Proteins, their IgG-Conjugates, and their Homopolymers. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand*, v.98, p.585-593, 1990.

- CITORES, L., FERRERAS, J.M., IGLESIAS, R., et al. Molecular mechanism of inhibition of mammalian protein synthesis by some four-chain agglutinins "Proposal of an extended classification of plant ribosome-inactivating protein (rRNA N-glycosidases)". *Febs Letters*, v.329, n.1/2, p.59-62, 1993.
- DESCOTES, G., ROMANO, M., STIRPE, F., et al. The Immunological Activity of Plants Toxins used in the Preparation of Immunotoxins-II. The Immunodepressive Activity of Gelonin. *Int. J. Immunopharmac.*, v.4, n.7, p.455-463, 1985.
- EIKLID, K., OLSNES, S., PIHL, A. Entry of lethal doses of Abrin, Ricin and Modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Experimental Cell Research*, v.126, p.321-326, 1980.
- ENDO, Y., MITSUI, K., MOTIZUKI, M., et al. The Mechanism of Action of Ricin and related Toxic Lectins on Eukaryotic Ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v.262, p.5908-5912, 1987.
- ENDO, Y., TSURUGI, K. RNA N-Glycosidase Activity of Ricin A-chain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.262, n.17, p.8128-8130, 1987.
- ENDO, Y., TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A chain: mechanism of action of the toxic lectin on eukaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v.263, p.8735-8739, 1988.
- ENDO, Y., GLUCK, A., WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.*, v.221, p.193-207, 1991.
- FALASKA, A., GASPERI-CAMPANI, A., ABBONDANZA, A., et al. Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, Momordica charantia inhibitor, and dianthins. *Biochemistry Journal*, v.207, p.505-509, 1982.
- FONG, W. P., WONG, R. N. S. GO, T. T. M., et al. Enzymatic properties of

- ribosome-inactivating proteins (RIPs) and related toxins. **Life Sciences**, v.4, p.1859-1869, 1991.
- FOXWELL, B. M. J., DONOVAN, T. A., THORPE, P. E., et al. The removal of carbohydrates from ricin with endoglycosidases H, F and D and mannosidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.840, p.193-203, 1985.
- HWANG, K.M., FOON, K.A., CHEUNG, P.H., et al. Selective Antitumor Effect on L10 Hepatocarcinoma Cells of a Potent Immunoconjugate Composed of the A Chain of Abrin and a Monoclonal Antibody to a Hepatoma-associated Antigen. **Cancer Research**, v.44, p.4578-4586, 1984.
- KIMURA, M., SUMIZAWA, T., FUNATSU, G. The Complete Amino Acid Sequences of the B-Chains of Abrin-a and Abrin-b, Toxic Proteins from the Seeds of *Abrus precatorius*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.57, n.1, p.166-169, 1993.
- LEWIS, M.S., YOULE, R.J. Ricin Subunit Association. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.25, p.11571-11577, 1986.
- LICASTRO, F., MORINI, M.C., BOLOGNESI, A., et al. Ricin induces the production of tumour necrosis factor and interleukin-1 by human peripheral-blood mononuclear cells. **Biochemistry Journal**, v.294, p.517-520, 1993.
- LUGNIER, A.A.J., KUNTZEL, H., DIIRHEIMER, G. Inhibition of *Neurospora crassa* and Yeast Mitochondrial Protein Synthesis by Ricin, A Toxic Protein Inactive on *E. coli* Protein Synthesis. **FEBS Letters**, v.66, n.2, p.202-205, 1976.
- MADAN, S., GHOSH, P.C. **Interaction of Gelonin with Macrophages: Effect of Lysosomotropic Amines**. **Experimental Cell Research**, v.198, p.52-58, 1992.
- MAGNUSSON, S., BERG, T., TURPIN, E., et al. Interactions of Ricin with Sinusoidal Endothelial Rat Liver Cells. **Biochemistry Journal**, v.277, p.855-861, 1991.
- MAGNUSSON, S., KJEKEN, R., BERG, T. Characterization of Two Distinct Pathways of Endocytosis of Ricin by Rat Liver Endothelial Cells. **Experimental Cell Research**, v.105, p.118-125, 1993.
- McINTOSH, D.P., HEATH, T.D. Liposome-Mediated Delivery of Ribosome Inactivating proteins to Cells in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.690, p.224-230, 1982.
- MONTECUCCHI, P.C., LAZZARINI, A.M., BARBIERI, L., et al. N-terminal sequence of some ribosome-inactivating proteins. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v.33, p.263-267, 1989.
- MONTFORT, W., VILLAFRANCA, J.E., MONZINGO, A.F., et al. The three-dimensional structure of ricin at 2,8 Å. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p. 5398-5403, 1987.
- MOTA, D.M. Pulchelin, lectinas galactose-específicas de sementes de *Abrus pulchellus*: **Purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997. 120p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 1997.
- NAMBIAR, M.P., WU, H.C. Ilimaquinone Inhibits the Cytotoxicities of Ricin, Diphtheria Toxin, and other Plant Toxins in Vero Cells. **Experimental Cell Research**, v.219, p.671-678, 1995.
- NICOLSON, G.L., BLAUSTEIN, J., ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, v.13, p.196-204, 1974.
- O'HARE, M., ROBERTS, L.M., THORPE, P.E., et al. Expression of ricin A chain in *Escherichia Coli*. **FEBS Letters**, v.216, p.73-78, 1987.
- OLSNES, S. SALTUEDT, E., PIHL, A. Isolation and comparison of galactose-binding Lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.803-810, 1974.

- RAMOS, M.V. Isolamento e caracterização parcial das isolectinas com atividades tóxica e hemaglutinante de sementes de *Abrus pulchellus* sub-espécie *tenuiflorus*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1993. 105p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 1993.
- READY, M.P., KIM, Y., ROBERTUS, J.D. Site Directed Mutagenesis of Ricin A Chain and Implications for the Mechanism of Actions. **Proteins**, v.10, p.270-278, 1991.
- SANDVIG, K., OLSNES, S., PIHL, A. Kinetics of Binding of the Toxic Lectins Abrin and Ricin to Surface Receptors of Human Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.251, n.13, p.3977-3984, 1976.
- SANDVIG, K., TONNESEN, T.I., OLSNES, S. Ability of Inhibitors of Glycosylation and Proteins Synthesis to Sensitize Cells to Abrin, Ricin, Shigella Toxin, and Pseudomonas Toxin. **Cancer Research**, v.46, p.6418-6422, 1986.
- SARGIACOMO, M., BARBIERI, L., STIRPE, F., et al. Cytotoxicity acquired by ribosome-inactivating proteins carried by reconstituted Sendai virus envelopes. **FEBS Letters**, v.157, n.1, p.150-154, 1983.
- SIENA, S., BREGNI, M., FORMOSA, A., et al. Evaluation of Antihuman T Lymphocyte Saporin Immunotoxins Potentially useful in Human Transplantation. **Transplantation**, v.46, n.5, p.747-753, 1988.
- SIMMONS, B.S., STAHL, P.D., RUSSELL, J.H., Mannose Receptor-mediated Uptake of Ricin Toxin and Ricin A Chain by Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.17, p. 7912-7920, 1986.
- SPERTI, S., MONTANARO, L., DERENZINI, M., et al. Effect of Modeccin on Rat Liver Ribosomes in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.562, p.495-503, 1979.
- SRINIVASAN, Y., RAMPRASAD, M.P., SUROLIA, A. Chemical modification studies of gelonin. **FEBS Letters**, v.192, n.1, p.113-118, 1985.
- STIRPE, F., BARBIERI, L. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS Letters**, v.195, p.1-8, 1986.
- STIRPE, F., OLSNES, S., PIHL, A. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.6947-6953, 1980.
- SUNDAN, A., EVENSEN, G., HORNES, E., et al. Isolation and *in vitro* expression of the ricin-A chain gene: effect of deletions on biological activity. **Nucleic Acids Res.**, v.17, n.4, p.1717-1732, 1989.
- TONEVITSKY, A.G. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. **FEBS Letters**, v.392, p.166-168, 1996.
- VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A. ROUGÉ, P., et al. The NeuAc((-2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v.235, p.128-137, 1996.
- VILLAFRANCA, J.E., ROBERTUS, J.D. Ricin B chain is a product of gene duplication. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, p. 554-556, 1981.
- YEUNG, H.W., LI, W.W., FENG, Z., et al. Trichosanthin and momorcharin: Identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. **Int. J. Pept. Prot. Res.**, v.31, p.265-268, 1988.
- WHIGHT, H.T., ROBERTUS, J.D. The Intersubunit Disulfide Bridge of Ricin Is Essential for Cytotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.256, n.1, p.280-284, 1987.
- ZARLING, J.N., et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. **Nature**, v.347, p.92-95, 1990.