

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

# **Aplicação de péptidos marinhos na terapia oncológica**

Cláudia Isabel Tomé Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Carlos Serafim  
Varela

Faro, setembro de 2017

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Química e Farmácia

# **Aplicação de péptidos marinhos na terapia oncológica**

Cláudia Isabel Tomé Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Carlos Serafim  
Varela

Faro, setembro de 2017

## **Aplicação de péptidos marinhos na terapia oncológica**

### **Declaração de autoria de trabalho**

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

Cláudia Reis

Copyright© Cláudia Isabel Tomé Reis

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

## **Agradecimentos**

A elaboração desta dissertação representa o culminar de uma etapa, que jamais teria sido possível sem o valioso contributo de todos aqueles que marcaram, que a nível profissional como pessoal, o meu percurso académico. Neste sentido, é imprescindível agradecer a quem tornou estes últimos cinco anos tão especiais.

Em primeiro lugar, o meu grande agradecimento ao meu orientador, o Professor Doutor João Varela, pela disponibilidade e prontidão que sempre revelou a cada vez que o abordei, bem como o auxílio e preocupação que demonstrou ao logo da execução da presente dissertação.

Aos docentes do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, com os quais tive o prazer de aprender e crescer. À Professora Doutora Isabel Ramalinho, pela dedicação e empenho que entrega ao curso MICF-UAIg trabalhando, dia após dia, para que este atinja um nível de excelência. À Professora Doutora Mónica Condinho, pelo seu profissionalismo, pela sua dedicação a tudo aquilo que faz, pela sua disponibilidade infinita para ajudar e por me fazer reconhecer as verdadeiras potencialidades da profissão farmacêutica.

Às instituições onde tive oportunidade de realizar estágios extra-curriculares e curriculares, Farmácia Portugal e Hospital do Espírito Santo de Évora, pela mais valia que estes representaram na minha aprendizagem e na minha evolução profissional enquanto futura farmacêutica.

À minha família, em especial à minha mãe, por ser a minha maior fonte de força e ânimo, pelo seu apoio constante, por festejar comigo todas as minhas vitórias e ajudar-me a vencer todas as batalhas.

Ao Nuno Palma, pela calma que sempre me transmitiu, pelo apoio imprescindível e pela presença constante em todos os momentos desta jornada.

À Alina Secrieru e Ana Sofia Bota, por representarem a minha segunda família no Algarve, pela forte amizade e por todos os momentos vividos durante estes cinco anos. Aos meus colegas Inês Afonso, Inês Pinho, Catarina Carrilho, Maria Romanciuc, Jéssica Vairinhos, Catarina Marreiros e Jorge Santos, por todo o companheirismo e ajuda.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos, João Sabino, Jorge Ferreira, Ana Carolina Ferreira, Cláudia Marques, Flávio Borlão e Nelson Santana, pela alegria que me transmitem e por constituírem um complemento importante na minha vida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuem dia-após-dia para a construção do meu “eu”, um muito obrigado!

## **Resumo**

O cancro representa um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, cuja incidência mundial atingiu os 14,1 milhões, em 2012. Em Portugal, os novos casos de tumores têm aumentado gradualmente e várias estimativas sugerem que, em 2030, a incidência de cancro ultrapasse os 60.000 casos.

O processo de carcinogénese reúne vários acontecimentos que conduzem à transformação de uma célula saudável em cancerígena. Após a formação do tumor, este adquire uma nomenclatura de acordo com a designação dos órgãos ou tecidos a partir dos quais se deu a génese do seu desenvolvimento.

Atualmente, as estratégias mais utilizadas para o tratamento do cancro compreendem a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Nesse sentido, é no âmbito da quimioterapia que esta dissertação se enquadra, através da seleção de um conjunto de péptidos de origem marinha com propriedades citotóxicas. Estes atuam de modo a inviabilizar as células cancerígenas, ou a interromper processos/inibir substâncias endógenas necessárias à proliferação celular.

O ecossistema marinho revelou, desde meados do século XX, um elevado potencial a nível da investigação científica. No âmbito da terapia oncológica foram aprovados, até à data, quatro novos fármacos relacionados com péptidos marinhos.

A presente dissertação procura abordar ao pormenor determinados péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica. Embora alguns deles já se encontrem aprovados pelas entidades reguladoras do medicamento, continuam a integrar os ensaios clínicos com vista à comprovação da sua eficácia e segurança, bem como à descoberta de associações com outros fármacos, de modo a obter efeitos sinérgicos.

Adicionalmente, será colocado em evidência o papel do farmacêutico, enquanto profissional de saúde que constitui o principal agente do medicamento. Este pode representar uma mais valia para a saúde do doente oncológico, no âmbito da institucionalização de terapias farmacológicas que integram péptidos marinhos com propriedades citotóxicas.

**Palavras-chave:** Brentuximab vendotina, cancro, dolastatina, péptidos marinhos, plitidepsina, trabectedina.

## **Abstract**

Cancer represents one of the major public health problems worldwide, with a world incidence of 14,1 million in 2012. In Portugal, new cases of tumours have gradually increased, and several estimates suggest that by 2030, the incidence of cancer will rise up to more than 60.000 cases.

The carcinogenesis includes a series of events that lead to the transformation of a healthy cell into a cancerous one. After tumour formation, it acquires a nomenclature according to the organ or tissue designation from developmental.

Currently, the most common strategies for the cancer treatment include surgery, radiotherapy and chemotherapy. Therefore, this thesis is inserted in the field of cancer chemotherapy, presenting a selection of peptides extracted from marine sources, which have demonstrated to bear cytotoxic effects. These compounds act on cancer cells, either directly by inhibition of their development, or by inhibition of other endogenous processes or substances necessary for cell proliferation.

Since the mid-twentieth century, the marine ecosystem has shown great potential in scientific research. In the field of cancer therapy, four new drugs related to marine peptides have been approved to date.

The present dissertation aims to explore in detail some marine peptides with application in the cancer therapy. Although some of them are already approved by the drug regulators, they continue to integrate clinical trials in order to evaluate their efficacy and safety, as well as studying possible associations with other drugs to obtain synergistic effects.

Additionally, the role of the pharmacist will be highlighted as the health professional who is the main agent of the drug. This health professional may represent an added value for the health of the cancer patient, in the scope of institutionalization of pharmacological therapies that integrate marine peptides with cytotoxic properties.

**Key words:** Brentuximab vedotin, cancer, dolastatin, marine peptides, plitidepsin, trabectedin.

## Índice Geral

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>ii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice Geral.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Quadros.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I: ENQUADRAMENTO.....</b>	<b>1</b>
1.1    INTRODUÇÃO.....	1
1.2    METODOLOGIA.....	3
<b>CAPÍTULO II: O CANCRO .....</b>	<b>4</b>
2.1    DEFINIÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	4
2.2    CICLO CELULAR .....	5
2.3    PROCESSO DE CARCINOGENESE .....	6
2.4    GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO TUMOR .....	9
2.5    CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS CANCERÍGENAS .....	11
2.6    TIPOS DE CANCRO.....	11
2.7    FATORES DE RISCO .....	12
2.8    INCIDÊNCIA.....	13
2.8.1 <i>Na Europa</i> .....	14
2.8.2 <i>Em Portugal</i> .....	15
2.9    TRATAMENTO .....	16
<b>CAPÍTULO III: PÉPTIDOS MARINHOS.....</b>	<b>19</b>
3.1    A IMPORTÂNCIA DOS PÉPTIDOS MARINHOS .....	19
3.2    TIPOS DE PÉPTIDOS MARINHOS .....	22
3.2.1 <i>Péptidos lineares</i> .....	23
3.2.2 <i>Péptidos cíclicos</i> .....	25
3.2.2.1    Vias de ciclização .....	26

3.3	PÉPTIDOS MARINHOS COM APLICAÇÃO NA TERAPIA ONCOLÓGICA.....	27
<b>CAPÍTULO IV: VIAS BIOSINTÉTICAS DOS PÉPTIDOS MARINHOS .....</b>		<b>29</b>
4.1	VIA RIBOSSOMAL.....	29
4.2	VIA NÃO-RIBOSSOMAL (POLICÉTIDOS SINTASES).....	31
<b>CAPÍTULO V: PÉPTIDOS MARINHOS COM APLICAÇÃO NA TERAPIA ONCOLÓGICA EM FASE DE ENSAIOS CLÍNICOS .....</b>		<b>36</b>
5.1	ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E ENSAIOS CLÍNICOS DE FASE I, II E III.....	36
5.2	PÉPTIDOS MARINHOS EM ENSAIOS CLÍNICOS E APROVADOS PARA A TERAPIA ONCOLÓGICA .....	37
5.3	TRABECTEDINA .....	40
5.3.1	<i>Mecanismo de ação</i> .....	43
5.3.2	<i>Trabectedina e ensaios clínicos</i> .....	45
5.4	DOLASTATINAS .....	46
5.4.1	<i>Mecanismo de ação</i> .....	49
5.5	AURISTATINAS .....	50
5.5.1	<i>Brentuximab vendotina (Adcetris®)</i> .....	52
5.5.2	<i>Mecanismo de ação</i> .....	52
5.5.3	<i>Brentuximab vendotina e ensaios clínicos</i> .....	54
5.6	DIDEMNINA B .....	55
5.6.1	<i>Mecanismo de ação</i> .....	56
5.7	PLITIDEPSINA .....	57
5.7.1	<i>Mecanismo de ação</i> .....	59
5.7.2	<i>Plitidepsina e ensaios clínicos</i> .....	62
<b>CAPÍTULO VI: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>		<b>64</b>
6.1	PAPEL DO FARMACÊUTICO .....	64
6.2	CONCLUSÃO.....	68
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>		<b>70</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> – Diagrama representativo do ciclo celular. Adaptado de Hunt <i>et al.</i> [14]. ...	6
<b>Figura 2.2</b> – Etapas da carcinogénese. Adaptado de <i>Manual de Oncología Clínica da UICC</i> [15]. .....	7
<b>Figura 2.3</b> – Evolução das alterações nas células saudáveis que determinam a transformação em células cancerígenas. Adaptado de <i>National Cancer Institute</i> [10]. ...	8
<b>Figura 2.4</b> – Processo de metastização de um tumor primário. Adaptado de <i>National Cancer Institute</i> [10]. .....	9
<b>Figura 2.5</b> – Incidência do cancro no mundo estimada em 2012, em ambos os sexos. Adaptado de <i>American Cancer Society</i> [29]. .....	13
<b>Figura 2.6</b> – Incidência de vários tipos de tumores estimada em 2012, em homens europeus. Adaptado de Ferlay <i>et al.</i> [30]. .....	14
<b>Figura 2.7</b> – Incidência de vários tipos de tumores estimada em 2012, em mulheres europeias. Adaptado de Ferlay <i>et al.</i> [30]. .....	15
<b>Figura 2.8</b> – Tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2012 (% relativa ao número total de casos). Adaptado de Miranda <i>et al.</i> [28]. .....	16
<b>Figura 3.1</b> – Organismos marinhos como fonte de PNM. Adaptado de Beesoo <i>et al.</i> [1]. .....	20
<b>Figura 3.2</b> – Relação entre a % de superfície ocupada no planeta e o número de espécies conhecidas nos ecossistemas marinho e terrestre. Adaptado de Cheung <i>et al.</i> [35]. .....	21
<b>Figura 3.3</b> – Estratégias envolvidas na síntese de um péptido cíclico, com elevada afinidade para a ligação a um alvo molecular. Adaptado de Roxin <i>et al.</i> [38]. .....	24
<b>Figura 3.4</b> – Tipos de ciclização de péptidos. Adaptado de White <i>et al.</i> [44]. .....	27
<b>Figura 4.1</b> – Elongação da tradução. Adaptado de Fixsen <i>et al.</i> [50]. .....	30
<b>Figura 4.2</b> – Princípios básicos da biossíntese de ácidos gordos e policétidos. Adaptado de Hertweck [52]. .....	32
<b>Figura 4.3</b> – Principais diferenças entre a via biossintética de ácidos gordos e de policétidos. Adaptado de Hertweck [52]. .....	33
<b>Figura 4.4</b> – Estruturas e mecanismos das PKS do tipo I (modular), II e III. Adaptado de Weissman [46]. .....	35

<b>Figura 5.1</b> – <i>Ecteinascidia turbinata</i> . Adaptado de Manning <i>et al.</i> [59]. .....	41
<b>Figura 5.2</b> – Estrutura química da trabectedina e respetiva bactéria ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) a partir da qual o péptido é, atualmente, obtido pela empresa PharmaMar. Adaptado de Larsen <i>et al.</i> [60]. .....	41
<b>Figura 5.3</b> – Interação da trabectedina com a RNA Polimerase II e posterior degradação desta enzima, com a consequente quebra da síntese de DNA. Adaptado de Larsen <i>et al.</i> [60]. .....	44
<b>Figura 5.4</b> – <i>Dolabella auricularia</i> . Adaptado de Maderna <i>et al.</i> [85]. .....	47
<b>Figura 5.5</b> – Estrutura química da dolastatina 10 e respetivos aminoácidos que fazem parte da sua constituição. Adaptado de Gajula <i>et al.</i> [86]. .....	47
<b>Figura 5.6</b> – Mecanismo de ação da dolastatina 10. Adaptado de Brandão <i>et al.</i> [87]. .....	49
<b>Figura 5.7</b> – Locais propícios a modificações estruturais nos análogos sintéticos da auristatina. Adaptado de Beesoo <i>et al.</i> [1]. .....	50
<b>Figura 5.8</b> – Estrutura química da monometil-auristatina E. Adaptado de Rawat <i>et al.</i> [89]. .....	51
<b>Figura 5.9</b> – Mecanismo de ação do anticorpo monoclonal brentuximab vendotina conjugado com o péptido monometil-auristatina E (MMAE). Adaptado de Eyre <i>et al.</i> [92]. .....	53
<b>Figura 5.10</b> – <i>Trididemnum solidum</i> . Adaptado de Ankisetty <i>et al.</i> [108]. .....	55
<b>Figura 5.11</b> – Estrutura química da didemnina B. Adaptado de Varela <i>et al.</i> [4]. .....	56
<b>Figura 5.12</b> – Diagrama esquemático que evidência o papel da didemnina B no bloqueio da elongação da tradução. Adaptado de Marco <i>et al.</i> [49]. .....	57
<b>Figura 5.13</b> – <i>Aplidium albicans</i> . Adaptado de Mayer <i>et al.</i> [36]. .....	57
<b>Figura 5.14</b> – Estrutura química da plitidepsina. Adaptado de Alonso-Álvarez <i>et al.</i> [111]. .....	58
<b>Figura 5.15</b> – Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação da plitidepsina no âmbito da indução da apoptose celular. Adaptado de Suárez <i>et al.</i> [112]. .....	59
<b>Figura 5.16</b> – Interação da plitidepsina com o fator eEF1A2, purificado a partir de amostras de músculo esquelético de coelho. Adaptado de Losada <i>et al.</i> [114]. .....	61

## Índice de Quadros

<b>Quadro 2.1</b> – Principais classes farmacoterapêuticas usadas em quimioterapia e respetivos mecanismos de ação, bem como exemplos dos fármacos a cada uma delas associados. Adaptado de <i>American Cancer Society</i> [32]. .....	17
<b>Quadro 3.1</b> – Péptidos marinhos lineares e cíclicos, fonte a partir do qual são obtidos e respetiva aplicação na terapia oncológica. Adaptado de Varela <i>et al.</i> [4]. .....	28
<b>Quadro 5.1</b> – Etapas envolvidas no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Adaptado de Costa-Lotufo <i>et al.</i> [7]. .....	37
<b>Quadro 5.2</b> – Péptidos marinhos em ensaios clínicos de Fase I, II e III e aprovados pela FDA para o tratamento de patologias oncológicas. Adaptado de <i>Marine Pharmacology</i> [56]. .....	38
<b>Quadro 5.3</b> – Análogos sintéticos da dolastatina 15. Adaptado de Larsen <i>et al.</i> [60]. ..	48

## **Lista de abreviaturas**

5-FU	5-Fluorouracilo
6-MP	6-Mercaptopurina
A (local)	Aminoacilo
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
AcF	Acompanhamento Farmacoterapêutico
ACP	Proteína Transportadora de Acetilos
AIM	Autorização de Introdução Mercado
ALT	Alanina aminotransferase
Ara-C	Citarabina
AST	Aspartato Aminotransferase
AT	Aciltransferase
AVD	Adriamicina, Vinblastina e Dacarbazina
c-JNK	Cinase N-terminal c-Jun
DGS	Direção Geral de Saúde
DH	Dehidratase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
E (local)	De saída
eEF	<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor</i>
eEF1A	<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A</i>
eEF1A2	<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A2</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	Enoil redutase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutationa
GTP	Guanosina trifosfato
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>

HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HVC	<i>Hepatitis C virus</i>
ILX-651	Sintadotina
INFARMED, I.P.	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P
Kd	Constante de dissociação
KR	Cetoreductase
KS	Cetosintase
LAGC	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LU-103793	Cemadotina
MMAE	Monometil-auristatina E
MMAF	Monometil-auristatina F
mRNA	RNA mensageiro
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P (local)	Peptidilo
p38/ MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitogénio p38
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	Recetor de morte programada-1
PD-L1	Ligando de morte programada-1
PD-L2	Ligando de morte programada-2
PKSs	Policétidos-sintases
PLD	Doxorrubicina Lipossomal Peguilhada
PNM	Produtos Naturais Marinhos
SAG	Sintases De Ácidos Gordos
SGN-35	Adcetris®/ brentuximab vendotina
TC-NER	<i>Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair</i>
TE	Tioesterase

TNF	Recetor de Necrose Tumoral
tRNA	RNA transferência
TZT-1027	Auristatina/ Soblidotina
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## **Capítulo I: Enquadramento**

### **1.1 Introdução**

Atualmente, as doenças oncológicas representam um dos principais problemas de saúde pública a nível global. A incidência atribuída à patologia oncológica é crescente, tendo-se verificado cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes por cancro em todo o mundo, no ano de 2012. De acordo com o Dr. Lee Jong-Wook, ex-diretor da Organização Mundial de Saúde (OMS), “até ao ano de 2020, o cancro poderá matar mais de 10,3 milhões de pessoas por ano, a menos que sejam tomadas ações no campo da prevenção e do tratamento da doença” [1,2].

O cancro pode resultar de um conjunto diverso de fatores, designados por agentes cancerígenos. Estes fatores incluem o tabaco, alguns agentes infecciosos, a radiação ionizante, a obesidade, o sedentarismo, a exposição a carcinogéneos ambientais e ocupacionais, entre outros. No entanto, o próprio efeito do material genético inerente a um determinado indivíduo pode, igualmente, contribuir para a promoção deste tipo de patologia [3].

O cancro tem origem mediante um processo designado carcinogénese, que reúne múltiplas etapas resultantes de sucessivas mutações, e cuja natureza é altamente polimórfica. Nesse sentido, é necessário a existência de uma bateria de testes de modo a diagnosticar, atempadamente, o cancro com precisão, bem como estratégias terapêuticas com seletividade suficiente para atuar de forma eficaz no tipo de cancro em questão [4].

Os tratamentos relacionados com a quimioterapia atualmente disponíveis reúnem várias classes farmacoterapêuticas. Estas dividem-se de acordo com as características dos fármacos que as integram em agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos anti-tumorais, inibidores da topoisomerase, antimetabólicos e agentes hormonais. Contudo, uma vez que nenhuma das classes é seletiva para células cancerígenas, frequentemente surgem efeitos adversos associados a este tipo de fármacos, como alopecia, diarreia, vômitos, náuseas, entre outros. É, então, necessário a melhoria das terapias existentes, bem como a descoberta de novos compostos com maior seletividade para as células cancerígenas, de modo a aumentar a taxa de sobrevivência dos doentes oncológicos e a diminuir o impacto dos efeitos adversos associados ao tratamento [5,6].

O ecossistema marinho revelou, desde meados do século XX, um elevado potencial e interesse a nível da investigação científica, atingindo o seu apogeu no século XXI, através da descoberta de novos organismos marinhos como fonte de compostos bioativos. A aplicação destes compostos estende-se a várias áreas, das quais a oncologia faz parte. As algas e os invertebrados foram os primeiros organismos explorados com vista à identificação de compostos marinhos com atividade citotóxica, em prol dos avanços nas técnicas de isolamento e caracterização química, bem como do aparecimento de equipamentos de mergulho seguros [7].

A citarabina (Ara-C) foi o primeiro fármaco a ser aprovado com aplicação na terapia oncológica, em 1969, por parte da FDA (*Food and Drug Administration*). Seguiu-se a trabectedina, que obteve aprovação pela EMA (*European Medicines Agency*) em 2007 e, anos mais tarde, em 2015, a aprovação pela FDA. No entanto, ainda são poucos os péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica que se encontram aprovados, embora dezenas de compostos se encontrem em ensaios pré-clínicos e clínicos [7,8].

A presente dissertação reúne como objetivo elucidar acerca do que representam os péptidos marinhos, bem como os tipos de péptidos que existem e as suas vantagens e desvantagens. Posteriormente, serão abordados alguns péptidos em específico, tendo por base uma escolha que assenta na potencialidade que cada um deles demonstra à luz da temática em questão. Cada um dos péptidos será analisado com vista a aferir acerca da sua estrutura química, via sintética, mecanismo de ação, seletividade tumoral e efeitos adversos associados a cada um deles.

## **1.2 Metodologia**

A presente dissertação de mestrado consiste numa revisão bibliográfica em torno de alguns péptidos marinhos, com propriedades que são reconhecidas como apropriadas para a aplicação na terapia oncológica e que, atualmente, se encontram em ensaios clínicos.

A pesquisa bibliográfica que suportou a informação documental utilizada teve como base o recurso a livros e a bases de dados, que possibilitaram o acesso a revistas e artigos científicos, de acordo com a área em questão. Desta forma, destacam-se as seguintes bases de dados, como aquelas que foram mais frequentemente utilizadas: PubMed, B-On, Web of Knowledge, Medscape e ResearchGate. Os termos mais utilizados para efetuar a pesquisa nas bases de dados referidas foram “marine peptides”, “cytotoxic peptides”, “linear peptides”, “cyclic peptides”, “trabectedin”, “dolastatin” e “plitidepsin”. A informação recolhida foi selecionada de acordo com a sua pertinência e utilidade, tendo sido considerados documentos redigidos em língua portuguesa, espanhola e inglesa, aproximadamente entre os anos de 2003 e 2017.

Adicionalmente, foram consultadas as páginas de internet de instituições governamentais reguladoras das áreas da saúde como a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED, I.P.), a Direção Geral de Saúde (DGS), a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Instituto Nacional do Cancro dos Estados Unidos da América (*National Cancer Institute* – NCI) e a Sociedade Americana do Cancro (*American Cancer Society*). Por último, as informações acerca dos ensaios clínicos relativos a cada um dos péptidos abordados foram obtidas a partir da página de internet *ClinicalTrials.gov*.

No âmbito da informação relativa à perspetiva do farmacêutico ajustada à temática da dissertação, foram consultados farmacêuticos da empresa Acompanhamento Farmacoterapêutico, Lda (AcF) e do Hospital do Espírito Santo de Évora, que possibilitaram a recolha de informação adicional acerca da relação da profissão farmacêutica com a temática em estudo.

## **Capítulo II: O cancro**

### **2.1 Definição e considerações gerais**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), “cancro” é o termo que caracteriza o processo de crescimento descontrolado e propagação celular, cuja manifestação pode afetar quase todo o corpo. O crescimento pode invadir os tecidos adjacentes e, até mesmo, formar metástases em locais distantes. Quando detetada atempadamente, a patologia oncológica pode ser tratada com recurso a tratamentos que habitualmente envolvem a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia [9].

Normalmente, as células crescem, maturam e dividem-se com vista à formação de novas células que, posteriormente, irão substituir as que envelhecem e morrem, fazendo com que a renovação celular seja um processo coordenado e contínuo no organismo. No entanto, este processo ordeiro pode falhar, verificando-se o aparecimento de um tumor ou neoplasia, que consiste na formação de novas células, em número superior ao necessário ou, na sobrevivência de células envelhecidas e/ou danificadas, ao invés da sua morte. Consequentemente, na presença de uma neoplasia, regista-se o desenvolvimento de uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excessivo e não coordenado, persiste de igual forma, mesmo após a interrupção do estímulo que originou as alterações [10-12].

Os tumores podem ser considerados benignos, quando não possuem a capacidade de metastização e permanecem no local onde ocorreu a sua formação, ou malignos, quando são capazes de invadir e danificar os tecidos e órgãos circundantes. Os tumores malignos são capazes de se libertar do tumor primitivo e entrar na corrente sanguínea ou no sistema linfático, formando novos tumores em diferentes órgãos. As metástases, por sua vez, sinalizam de forma evidente um tumor como maligno, uma vez os tumores benignos não metastatizam. A metastização é um processo complexo, constituído por etapas fulcrais, das quais se destacam a perda da capacidade de adesão entre as células; a degradação e invasão da membrana basal; a deterioração da matriz extracelular; a entrada do tumor nos vasos sanguíneos ou linfáticos e a sua sobrevivência na circulação e; por último, a identificação de um órgão no qual, posteriormente, o tumor se irá estabelecer [10,12].

Em geral, os tumores benignos são bem diferenciados enquanto que, as neoplasias malignas, possuem uma vasta gama de diferenciação celular, que engloba

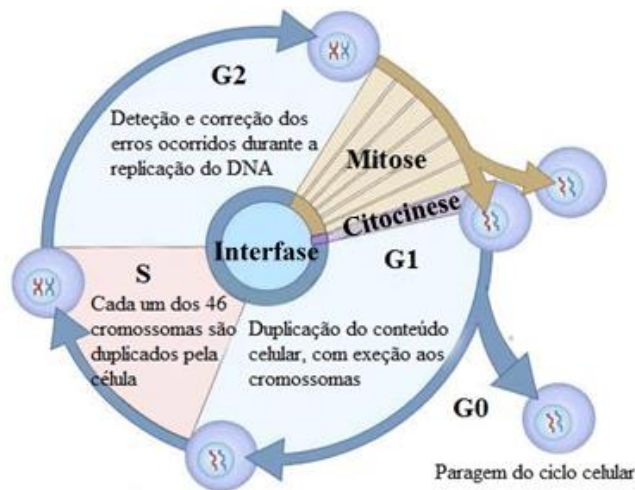
tanto as células perfeitamente diferenciadas, como as células completamente indiferenciadas [10,12].

## **2.2 Ciclo celular**

Uma das causas inerentes ao aparecimento de cancro relaciona-se com o crescimento e replicação celular descontrolados [13]. Nesse sentido, torna-se indispensável o esclarecimento dos princípios básicos acerca do processo de divisão celular.

Ao conjunto de transformações que uma célula sofre, desde a sua génese até ao momento em que sofre replicação, dá-se a designação de ciclo celular. Nos eucariotas, este é um processo complexo e coordenado, que compreende duas etapas fundamentais: interfase e mitose. A interfase é a fase mais longa do ciclo celular e abrange o período decorrido entre o final de uma divisão celular e o início da divisão celular seguinte. Por sua vez, a interfase divide-se em quatro períodos distintos: G1, S, G2 e G0. A fase G1 consiste numa etapa de preparação para a duplicação do material genético, marcada pela intensa síntese de enzimas necessárias à replicação. Durante o período S ocorre a replicação semi-conservativa do ácido desoxirribonucleico (DNA), permitindo a transformação da célula diploide ( $2n$ ) em tetraploide ( $4n$ ), de modo a que esta passe a dispor de duas cópias exatamente iguais do seu DNA. O período G2 confere à célula a preparação para a fase mitótica, e possibilita a síntese das proteínas necessárias para que esta entre em divisão celular. É, também, nesta fase que ocorre a deteção e, conseqüentemente, a correção dos erros ocorridos durante a replicação do DNA. A fase G0 não se manifesta em todas as células, sendo um período no qual não se verifica a divisão celular [13,14].

Terminada a interfase, a célula entra em mitose, que consiste na divisão nuclear, da qual resulta a formação de dois núcleos exatamente iguais aos da célula que lhes deu origem. A divisão do citoplasma, citocinese, ocorre nas últimas fases da mitose e permite à célula dar origem a duas células-filhas [13,14].



**Figura 2.1 – Diagrama representativo do ciclo celular.** De notar que, na fase G0, a célula entra num período de quiescência, pelo que a divisão celular não ocorre. Esta fase não se manifesta em todas as células, sendo habitualmente observável em células musculares e nervosas. Adaptado de Hunt *et al.* [14].

### 2.3 Processo de carcinogénese

Durante o desenvolvimento de uma neoplasia, as células cancerígenas têm origem a partir de células saudáveis, mediante um processo denominado transformação. A carcinogénese é o termo utilizado para a descrição da cascata de eventos responsável pela transformação de uma célula saudável em cancerígena. Este processo reúne múltiplas etapas resultantes de sucessivas mutações, que compreendem tanto as alterações do fenótipo adquirido pelas células, como alterações a nível genético [12,15].

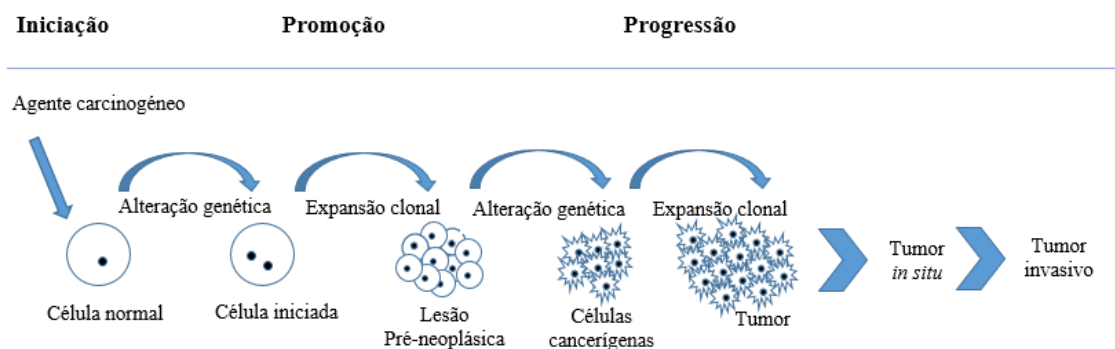
A primeira etapa consiste na iniciação, na qual ocorre uma mudança significativa e irreversível no material genético da célula mediada pela ação de um agente carcinogénico, que pode ser um produto químico, um vírus, a radiação ionizante, entre outros. Uma vez que nem todas as células são igualmente suscetíveis aos agentes carcinogénicos, muitas vezes, as alterações genéticas na célula ou outro agente, denominado de promotor, são fundamentais para aumentar a possibilidade de conversão das células saudáveis em cancerígenas. De notar que, nesta fase, as células embora geneticamente alteradas, são difíceis de detetar clinicamente, conduzindo a um atraso no diagnóstico do tumor. O cancro pode ser considerado uma doença genética, uma vez que pode ter como origem alterações nos genes cuja função consiste no controlo de diversos processos celulares, como o crescimento e a divisão celular. Estas alterações genéticas envolvem a ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor, podendo

estar associadas a mutações na sequência de nucleótidos e topologia do material genético como inserções, deleções, entre outras [16,17].

Segue-se a etapa de promoção, na qual a célula que iniciou a sua mudança procede à transformação em célula cancerígena. Para que se verifique a existência de um cancro, é necessário a combinação de uma célula suscetível e de um agente carcinogénico, uma vez que a promoção não apresenta efeito sobre as células que não foram submetidas ao processo de iniciação [15,17].

A progressão é o último estágio da carcinogénese, no qual as células mutadas sofrem uma multiplicação descontrolada e irreversível. Este estágio é, também, caracterizado por alterações moleculares adicionais; um aumento do tamanho e da agressividade da massa tumoral primária; um forte potencial de disseminação; e a invasão de outros órgãos ou tecidos [15,17].

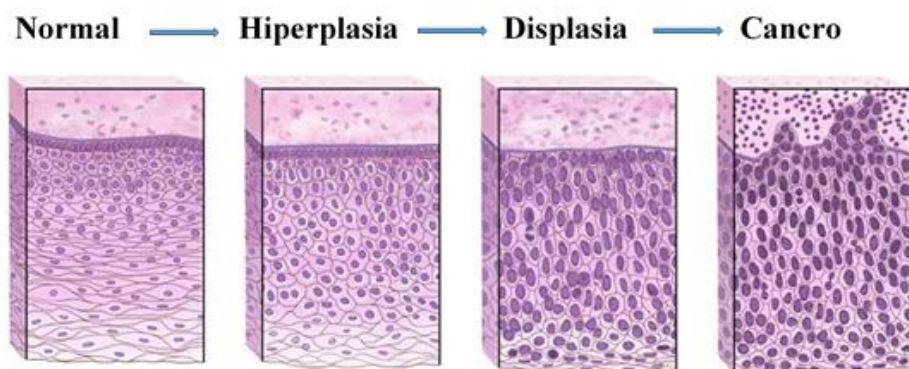
Em termos de análise citológica, durante a carcinogénese, as células saudáveis iniciam um processo de divisão mais rápido do que aquele que é presumível, originando células adicionais que podem acumular-se ou, por sua vez, sofrerem uma nova replicação. A este conjunto de procedimentos dá-se o nome de hiperplasia, termo que caracteriza o aumento das células em número superior ao normal num dado órgão ou tecido. De notar que, embora se verifique um crescimento excessivo nesta fase, o tecido formado a partir destas células revela uma aparência relativamente normal. Por sua vez, a displasia diz respeito a um estado mais grave de hiperplasia, na qual existe igualmente acumulação de células adicionais, com a agravante de que estas células já adquiriram um material genético diferente daquele que determina as células saudáveis. Para além disso, as células displásicas possuem um aumento da razão que reflete o tamanho do núcleo em função do conteúdo citoplasmático, uma maior atividade mitótica e um défice de certas características citoplasmáticas associadas à normal diferenciação tecidular [12,18].



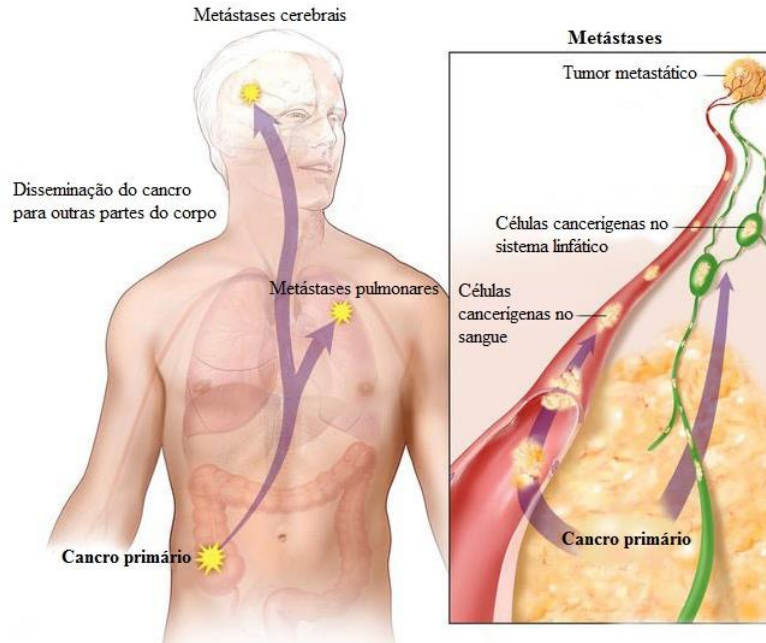
**Figura 2.2 – Etapas da carcinogénese.** Adaptado de *Manual de Oncologia Clínica da UICC* [15].

Em geral, quanto mais visíveis forem as alterações celulares e tecidulares, maior será a probabilidade de desenvolvimento do cancro. A displasia é, então, considerada como um estado de transição entre a passagem de um crescimento benigno para o momento em que este adquire características de malignidade. Quando se verificam alterações displásicas marcantes, que envolvem toda a espessura do epitélio, porém a lesão permanece confinada pela membrana basal, trata-se de um neoplasma pré-invasivo, que adquire a designação de tumor *in situ*. Porém, aquando do rompimento da membrana basal pelas células cancerígenas e a invasão de tecidos díspares do tecido de origem, o tumor adquire a designação de invasivo [10,18]. A Figura 2.3 ilustra o processo de proliferação e rearranjo tecidular, desde o estado saudável, até ao estabelecimento da patologia cancerígena.

Durante o decorrer do processo de metastização, as células cancerígenas adquirem a capacidade de disseminação desde o local de origem, veiculadas através do sangue ou do sistema linfático, e promovem a formação de novos tumores, designados tumores metastáticos, noutras partes do organismo (Figura 2.4). Por sua vez, o tumor metastático adquire o mesmo nome e possui o mesmo tipo de células cancerígenas que o tumor primário que lhe deu origem [10].



**Figura 2.3 – Evolução das alterações nas células saudáveis que determinam a transformação em células cancerígenas.** Adaptado de *National Cancer Institute* [10].



**Figura 2.4 – Processo de metastização de um tumor primário.** Adaptado de *National Cancer Institute* [10].

O desenvolvimento de um cancro pode ser caracterizado por duas fases, a que compreendem a fase pré-clínica e a fase clínica. A fase pré-clínica diz respeito ao período de latência do tumor e engloba o tempo decorrido durante a indução do mesmo. A duração desta fase pode ser curta, cujo decurso é de poucos meses após a iniciação, ou longa, na qual se manifesta uma durabilidade de muitos anos, (o que, frequentemente, acontece nos cancros do cólon, pulmão, mama e bexiga) [15].

Em oposição, a fase clínica da história natural de um cancro tem início no momento em que o tumor é, definitivamente, diagnosticado. Neste sentido, os sintomas começam a manifestar-se no doente e a terapia torna-se necessária, na tentativa de curar ou tratar paliativamente o doente com o tumor [15].

## 2.4 Genes envolvidos na formação do tumor

Os genes habitualmente mais afetados pelas alterações genéticas que conduzem ao aparecimento de cancro são os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes reparadores do DNA [19].

Além das mutações, as alterações epigenéticas representam igualmente um fator contribuinte para a origem das anomalias celulares. Estas alterações influenciam a expressão dos genes e o comportamento celular. No entanto, embora uma vez adquiridas sejam transmitidas às células filhas através da divisão celular, não são consideradas alterações na sequência nucleotídica, as quais teriam impacto na constituição da sequência de aminoácidos de uma proteína [19].

Os proto-oncogenes são genes responsáveis pela codificação de proteínas que intervêm na proliferação e divisão celulares. Quando alterados, transformam-se em oncogenes, capazes de promover o crescimento celular, na ausência de qualquer tipo de sinal promotor do crescimento. Conseqüentemente, são responsáveis pela conversão de células saudáveis em células cancerígenas. Os oncogenes podem ter origem a partir mutações a nível dos proto-oncogenes, como também pela aquisição de material genético estranho, frequentemente transmitido através de um vírus [19]. As proteínas codificadas pelos proto-oncogenes possuem múltiplas funções, podendo atuar como fatores de crescimento ou os seus recetores, transdutores de sinal, fatores de transcrição ou, até mesmo, como componentes do ciclo celular [13,16,19].

Os genes supressores de tumor desempenham um papel importante a nível do crescimento e divisão celulares, na medida em que exercem um controlo negativo sobre a multiplicação celular. A maioria dos genes supressores de tumor fazem parte de uma rede regulatória, que reconhece a toxicidade genética de uma célula e promove a finalização da respetiva proliferação. Deste modo, alterações nestes genes conduzem a uma maior probabilidade para as células se dividirem descontroladamente [12,16]. Geralmente, se apenas uma cópia do gene supressor tumoral estiver inativa, a célula é considerada como não tumoral. Por outro lado, se ambas as cópias se apresentarem inativas, pode ocorrer a perda do controlo da divisão celular, com a conseqüente formação de um tumor [15]. As proteínas resultantes da codificação pelos genes supressores de tumor podem desempenhar funções como fatores de transcrição, inibidores do ciclo celular, moléculas transdutoras de sinal, recetores de superfície celular e reguladores da resposta celular perante danos no DNA [12,20].

Por fim, os genes reparadores do DNA, responsáveis pela reparação de modificações ou danos no DNA, quando mutados, são incapazes de exercer a sua função, conduzindo ao desenvolvimento de mutações adicionais nas células em desenvolvimento e à propagação desses mesmos erros no material genético [10].

## **2.5 Características das células cancerígenas**

As células cancerígenas apresentam determinadas particularidades que as permitem distinguir das células saudáveis, possibilitando o seu crescimento descontrolado e a invasibilidade do organismo. Por um lado, destaca-se a capacidade ilimitada de divisão celular que se deve à sua menor especialização, quando comparadas com as células saudáveis, estas capazes de amadurecer em vários tipos de células diferentes, com um arsenal de funções específicas [10]. Não obstante, as células cancerígenas podem induzir a formação de vasos sanguíneos, localizados nas proximidades do tumor, e assegurar o aporte de oxigénio e nutrientes necessários ao desenvolvimento deste, bem como garantir a remoção de resíduos potencialmente prejudiciais, num processo que adquire a designação de angiogénese [19]. Por outro lado, é de notar a capacidade das células cancerígenas em ignorar os sinais condutores à apoptose, isto é, à morte programada das células, permitindo a sobrevivência e manutenção do tumor no organismo. Destaca-se, também, a insensibilidade das células cancerígenas aos sinais inibidores do crescimento, o que promove a sua proliferação e desenvolvimento. As células cancerígenas são capazes de subverter o sistema imunitário, podendo tirar partido do mesmo para permitir o próprio crescimento do tumor. Além disso, podem diminuir a funcionalidade de toda uma rede de órgãos, tecidos e células especializadas que protegem o organismo contra infeções e outras doenças. Tanto as células malignas como os seus próprios núcleos demonstram, habitualmente, um pleomorfismo, isto é, uma variação a nível do tamanho e da forma. Deste modo, as células diferem dentro de um mesmo tumor, apresentando tamanhos que variam desde células de tamanho considerável, até células extremamente pequenas e de aspeto primitivo [10-12].

## **2.6 Tipos de cancro**

Em geral, os tumores adquirem a designação dos órgãos ou tecidos a partir dos quais se deu a génese do seu desenvolvimento. Os carcinomas são tumores malignos formados a partir de células epiteliais e representam o tipo de cancro mais comum. Os adenocarcinomas, por exemplo, representam um género de carcinomas que se forma em células epiteliais produtoras de fluidos ou muco, vulgarmente chamadas glândulas mucossecretoras. Por outro lado, os sarcomas são cancros capazes de atingir as células da

mesoderme, com origem no osso ou tecidos moles, e podem afetar os músculos, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido fibroso, entre outros órgãos [21]. Os cancros com origem na medula óssea adquirem o nome de leucemias e são incapazes de formar tumores sólidos. Contudo, as células cancerígenas acumulam-se no sangue e na medula óssea, de modo a comprometer as funções vitais das células saudáveis que restam, como a obtenção de oxigénio ou o combate a infeções. As leucemias podem ser classificadas de acordo com o tempo de progressão da patologia oncológica em agudas ou crónicas e, ainda, com base na linhagem celular que lhes deu origem, em linfocíticas ou mieloides [21,22]. Os linfomas constituem um tipo de cancro com origem nos linfócitos (B ou T). Os linfócitos afetados podem acumular-se nos gânglios linfáticos ou noutros órgãos como o baço ou a medula óssea, fazendo com que estes aumentem de volume. Os dois principais tipos de linfomas são o linfoma de Hodgkin (geralmente com origem nos linfócitos B) e o linfoma não-Hodgkin (com origem nos linfócitos B ou T) [21,23]. Adicionalmente, o mieloma múltiplo tem origem nas células plasmáticas, que se acumulam na medula óssea e induzem a formação de tumores ósseos no organismo [24]. Os melanomas designam os tumores de melanócitos (células produtoras de melanina) e, habitualmente, desenvolvem-se na pele, podendo ter origem em outros tecidos pigmentados, como o olho [21,25].

## 2.7 Fatores de risco

Não é possível efetuar uma previsão acerca da possibilidade de um indivíduo poder vir a desenvolver cancro em detrimento de outro. No entanto, são conhecidos vários fatores de risco preditivos ao aparecimento da doença que podem ser controláveis, como fatores comportamentais ou a exposição a certas substâncias químicas; ou não controláveis, como a idade e a hereditariedade [3].

Deste modo, destacam-se como principais causas para a origem da patologia oncológica o tabaco; o álcool; a dieta desequilibrada, acompanhada da baixa ingestão de frutas e vegetais; o sedentarismo; a obesidade; a radiação ionizante (isto é, radiação de alta energia como os raios-X e a radiação gama); a radiação ultravioleta (UV); a poluição atmosférica urbana (que tem como resultado a exposição a compostos de benzeno, asbestos, entre outros); certas hormonas envolvidas na terapêutica hormonal de substituição; alguns vírus agentes infecciosos, como o vírus da hepatite B (*hepatitis B virus* – *HBV*) e o vírus da hepatite C (*hepatitis C virus* – *HCV*); e, ainda, agentes infecciosos

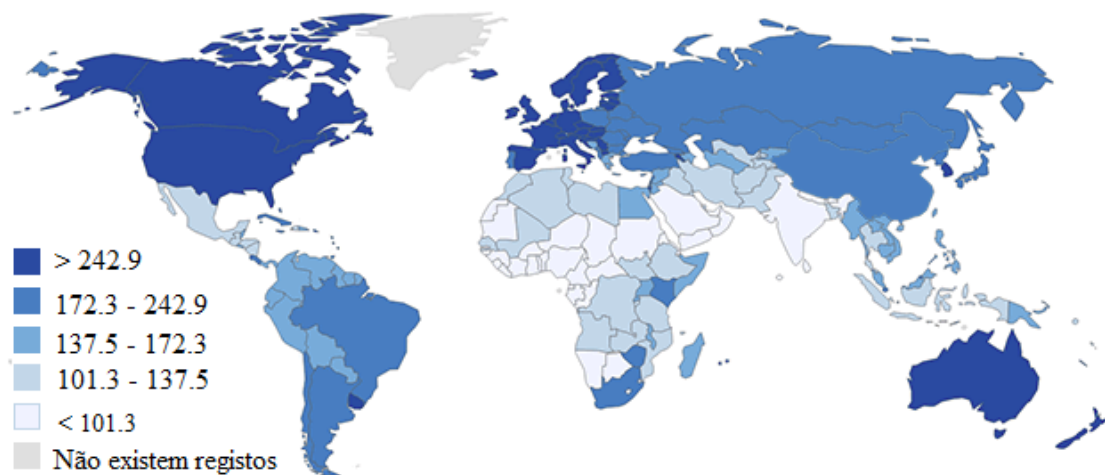
sexualmente transmissíveis, como o vírus do papiloma humano (*human papillomavirus* – HPV) [3,26].

As medidas preventivas assentam, sobretudo, no controlo da exposição aos fatores do risco controláveis, na prática de um estilo de vida saudável, bem como na vacinação contra os agentes infecciosos promotores do processo de carcinogénese [27].

## 2.8 Incidência

A incidência de uma doença define-se como o número de novos casos ocorridos numa população, durante um determinado período de tempo. Segundo a OMS, em 2012 verificaram-se cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes por cancro em todo o mundo. Em 2030, é expectável que estes valores aumentem em pelo menos 70%, embora também se verifique um número superior de sobreviventes à patologia oncológica. Deste modo, o cancro tem sido considerado progressivamente como uma doença crónica, ao invés de uma patologia aguda e causadora de morte [2,28].

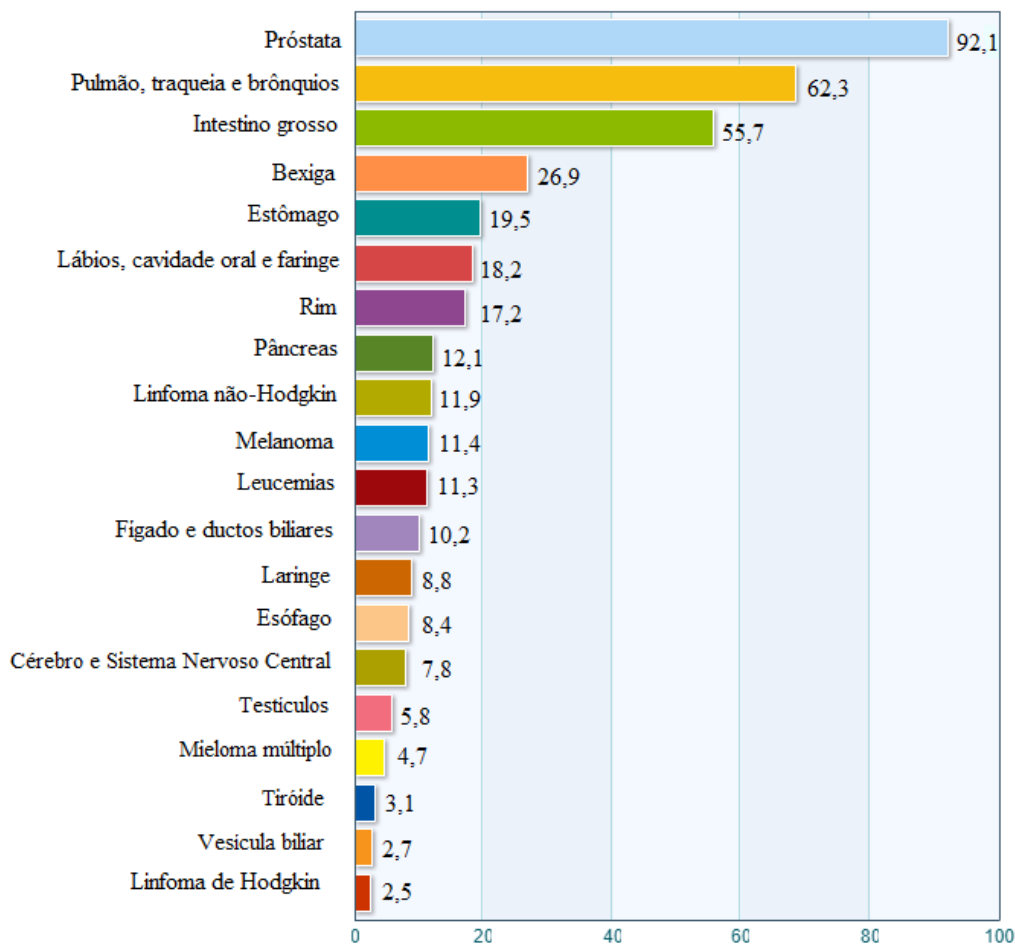
### Incidência do cancro no mundo estimada em 2012, em ambos os sexos



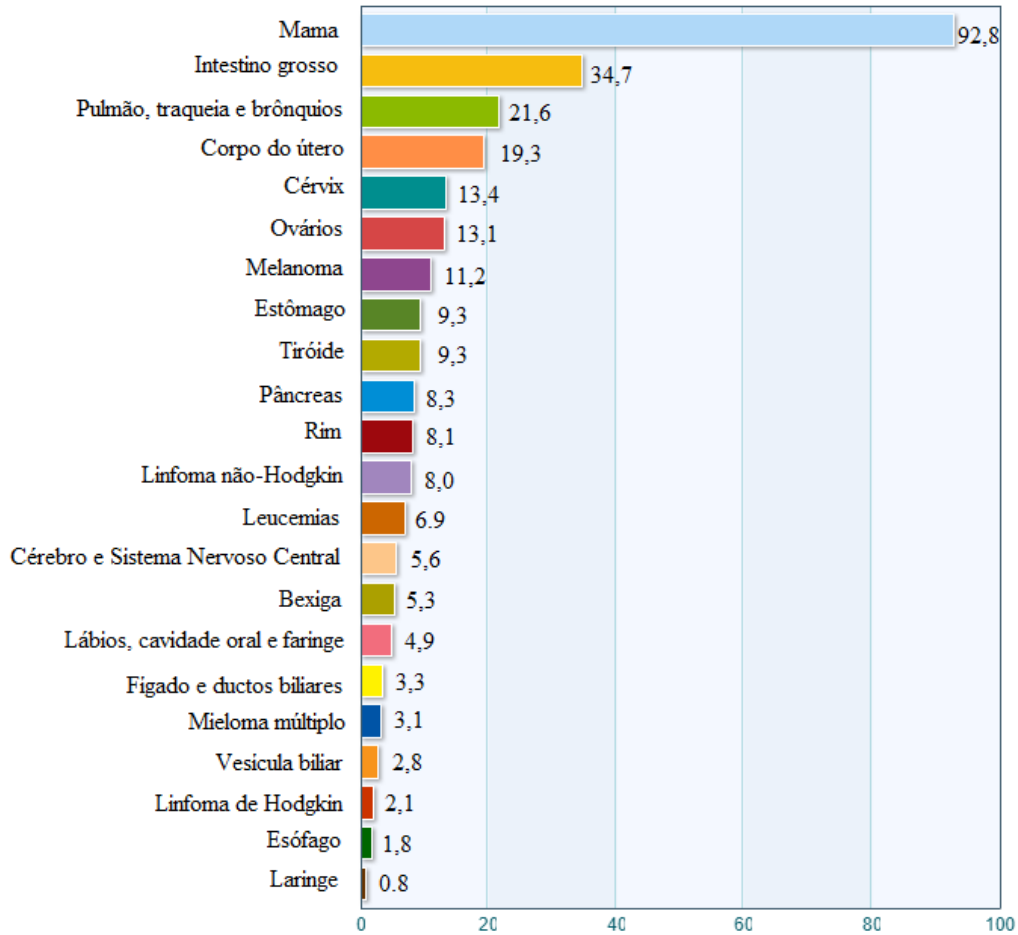
**Figura 2.5 – Incidência do cancro no mundo estimada em 2012, em ambos os sexos.** Os valores presentes na legenda correspondem a uma taxa relativa a cada 100.000 pessoas. Tal como é dedutível a partir da imagem, os países da América do Norte, da Europa e Oceânia são aqueles que revelaram maior incidência de cancro no respetivo ano. Adaptado de *American Cancer Society* [29].

### 2.8.1 Na Europa

O cancro representa a principal causa de mortalidade e morbilidade em toda a Europa. Em 2012, registaram-se cerca de 3,4 milhões de novos casos, segundo a OMS. Os tumores com maior incidência variam consoante o género feminino e masculino. O cancro da mama, por exemplo, foi o principal tumor associado ao sexo feminino em 2012, atingindo cerca de 92,8 em cada 100.000 mulheres, sobretudo na Europa do Norte e Ocidental. Por outro lado, o cancro da próstata foi o cancro mais incidente no sexo masculino, e registou um número de novos casos de 92,1 em cada 100.000 homens europeus. Os tumores localizados no intestino grosso e nas vias respiratórias (pulmão, traqueia e brônquios) são frequentes em ambos os sexos, estando fortemente associados ao défice de uma alimentação saudável e ao tabagismo. A maior incidência relativa a estes tumores é registada nos países da Europa Central e Oriental [30].



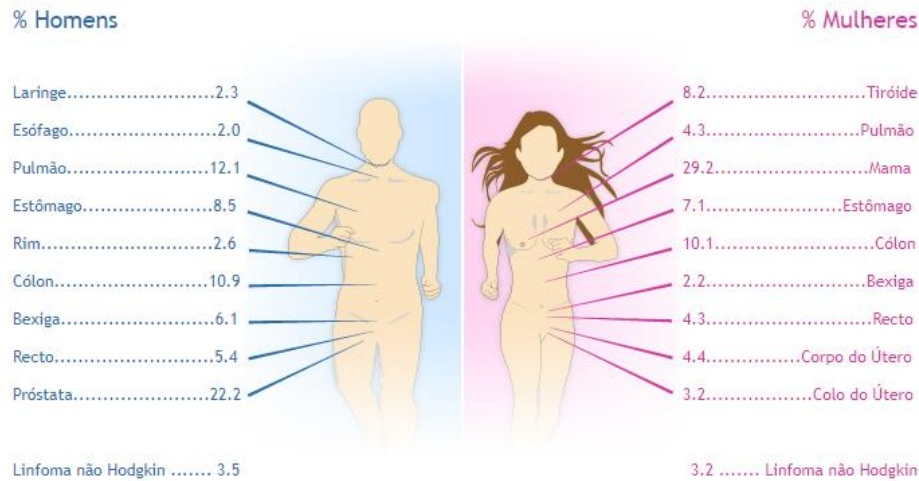
**Figura 2.6 – Incidência de vários tipos de tumores estimada em 2012, em homens europeus.** Os valores presentes na legenda correspondem a uma taxa relativa a cada 100.000 pessoas. Adaptado de Ferlay *et al.* [30].



**Figura 2.7 – Incidência de vários tipos de tumores estimada em 2012, em mulheres europeias.** Os valores presentes na legenda correspondem a uma taxa relativa a cada 100.000 pessoas. Adaptado de Ferlay *et al.* [30].

### 2.8.2 Em Portugal

Em Portugal, o aumento da incidência está diretamente relacionado com o prolongamento da esperança média de vida. Os dados mais recentes, conhecidos até à data, apontam para 2012 e traduzem uma taxa de incidência de tumores malignos de 444,50 em cada 100.000 pessoas. As regiões mais afetadas correspondem os distritos de Viana do Castelo, Vila Real, Bragança, Setúbal e Beja. À semelhança do que ocorre na restante Europa, em Portugal as principais patologias oncológicas localizam-se na mama, próstata, cólon e pulmão (Figura 2.8) [28].



**Figura 2.8 – Tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2012 (% relativa ao número total de casos).** Adaptado de Miranda *et al.* [28].

## 2.9 Tratamento

Existem diversos tipos de tratamento para o cancro e a escolha de um em detrimento de outro varia de acordo com o tipo de cancro e o estado de progressão da doença [6].

A cirurgia permite a remoção de um tumor que não sofreu metastização e que se encontra bem localizado, numa determinada zona do corpo [6,31-33].

A radioterapia é usada para tumores confinados a uma área específica, tal como a cirurgia, e consiste na emissão de altas doses de radiação que vão incidir sobre as células cancerígenas de modo a destruí-las, reduzindo o volume do tumor [6,31-33].

A quimioterapia recorre ao uso de medicamentos, designados citotóxicos, com o objetivo de inviabilizar as células cancerígenas ou interromper processos/inibir substâncias endógenas necessárias à proliferação celular. Atualmente, são conhecidas diversas classes farmacoterapêuticas com vista ao tratamento da patologia oncológica (Quadro 2.1). De acordo com o tipo de cancro e o fármaco citotóxico utilizado, a via pela qual este é administrado pode variar entre a via oral, intramuscular, subcutânea e intravenosa. Frequentemente, a via intravenosa é a mais utilizada, uma vez que é aquela que permite uma maior biodisponibilidade do fármaco na corrente sanguínea. Contudo, o arsenal de efeitos adversos associado a estes fármacos, como mielossupressão, alopecia, mucosite, diarreia, vômitos, náuseas, maior predisposição às infeções oportunistas devido ao comprometimento do sistema imunitário, esterilidade, entre outros, torna a terapêutica

bastante destrutiva. É, pois, necessário o desenvolvimento de fármacos mais seletivos para as células cancerígenas, de modo a diminuir a carga de efeitos adversos manifestados sob as células saudáveis. O esquema de quimioterapia pode conter apenas um fármaco, como também recorrer ao uso de várias classes, designadamente quimioterapia de combinação. Atendendo ao facto de que cada classe possui um modo de ação específico e atua em diferentes fases do ciclo celular, a associação de fármacos é vantajosa na medida em que permite aumentar a eficácia do tratamento [5,32,33].

Por outro lado, o tratamento pode ser biológico, no qual se destacam a imunoterapia e a terapia génica. A imunoterapia recorre ao uso de fármacos que permitam auxiliar o próprio sistema imunitário na deteção e combate do tumor. A terapia génica, por sua vez, possibilita o uso de um tratamento ajustado à compreensão genética de cada tipo de cancro [5,6,32].

Na esmagadora maioria dos casos, o tratamento dos tumores engloba a combinação de diversos tipos como a cirurgia e a quimioterapia ou a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia [5,32,33].

**Quadro 2.1 – Principais classes farmacoterapêuticas usadas em quimioterapia e respetivos mecanismos de ação, bem como exemplos de fármacos a cada uma delas associados.** Adaptado de *American Cancer Society* [32].

<b>Classe farmacológica</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Agentes alquilantes</b>	Estabelecimento de ligações covalentes com locais nucleófilos do DNA, provocando erros de emparelhamento entre bases azotadas ou quebras nas cadeias em formação.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mecloretamina</li> <li>• Clorambucil</li> <li>• Mefalam</li> <li>• Ciclofosfamida</li> <li>• Ifosfamida</li> <li>• Lomustina</li> <li>• Procarbazina</li> <li>• Cisplatina</li> <li>• Bussulfano</li> </ul>
<b>Anti-metabolitos</b>	Atuam por incorporação de um “falso” metabolito, não funcional, durante as vias metabólicas celulares e inibem a função catalítica de uma enzima ou sistema enzimático.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5-Fluorouracilo (5-FU)</li> <li>• 6-Mercaptopurina (6-MP)</li> <li>• Citarabina</li> <li>• Metotrexato</li> <li>• Trimetrexato</li> </ul>
<b>Antibióticos anti-tumorais</b>	Atuam por alquilação no DNA, inibição enzimática, quebração dos iões bivalentes e alteração da função da membrana plasmática.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doxorrubicina</li> <li>• Epirubicina</li> <li>• Actinomicina-D</li> <li>• Bleomicina</li> <li>• Mitomicina-C</li> </ul>

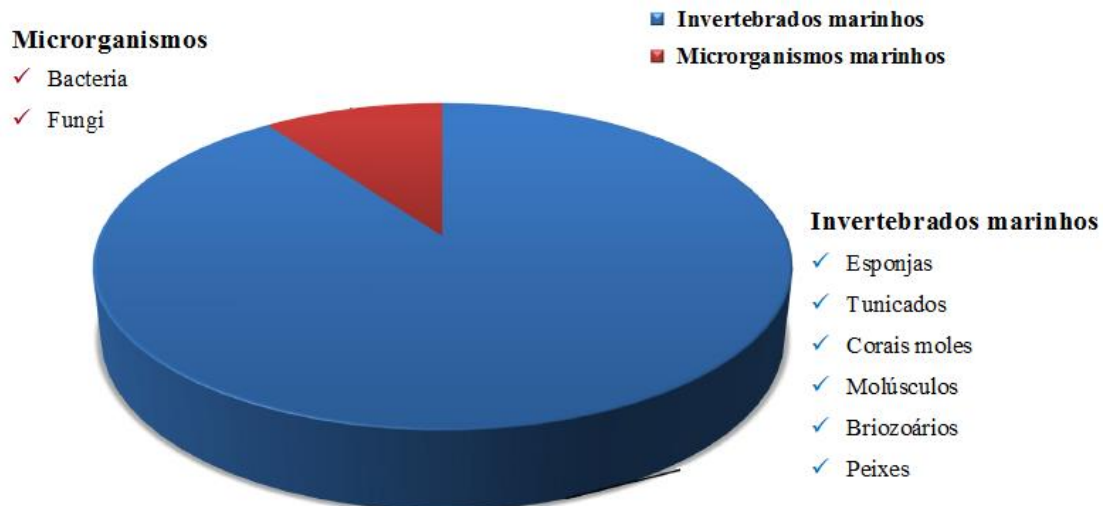
**Quadro 2.1 – Principais classes farmacoterapêuticas usadas em quimioterapia e respetivos mecanismos de ação, bem como exemplos de fármacos a cada uma delas associados.** Adaptado de *American Cancer Society* [32].

<b>Classe farmacológica</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Inibidores da topo-isomerase</b>	Atuam por inibição das enzimas necessárias ao desenrolamento da cadeia de DNA, para posterior transcrição do material genético.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Topotecano</li><li>• Irinotecano</li><li>• Etoposido</li><li>• Teniposido</li></ul>
<b>Antimitóticos</b>	Atuam por inibição da ligação dos microtúbulos, impedindo a mitose.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Docetaxel</li><li>• Paclitaxel</li><li>• Vincristina</li><li>• Vinblastina</li><li>• Vinorelbina</li></ul>
<b>Agentes hormonais</b>	O mecanismo de ação varia de acordo com o tipo de cancro, na medida em que o crescimento de vários tumores é influenciado pelo ambiente hormonal.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tamoxifeno (usado no cancro da mama avançado, ER-positivo)</li><li>• Bicalutamida (usado no cancro da próstata)</li></ul>

## **Capítulo III: Péptidos marinhos**

### **3.1 A importância dos péptidos marinhos**

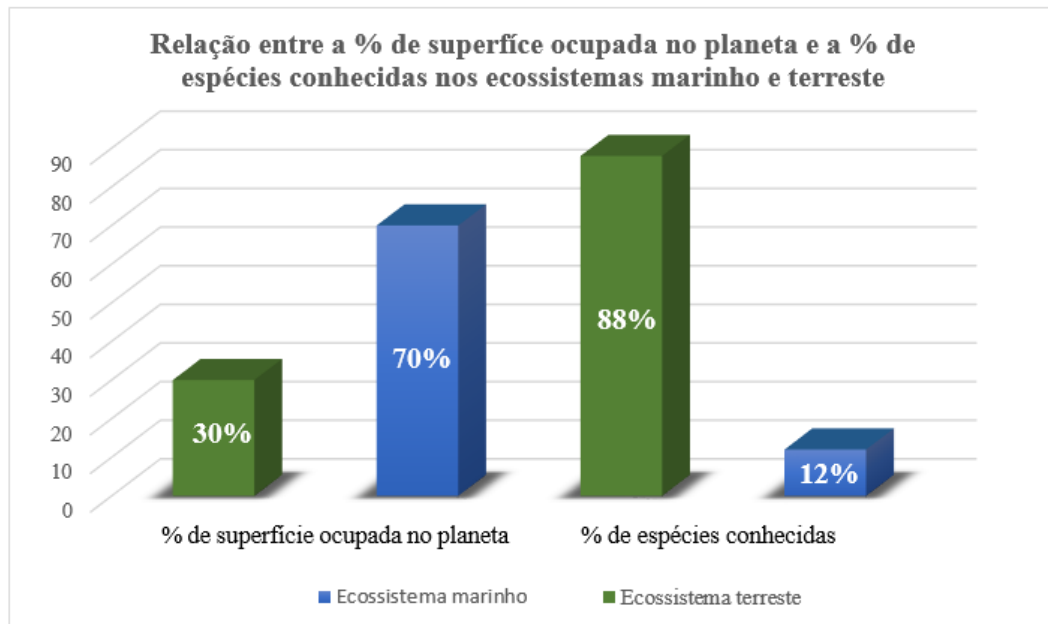
Cerca de 70% da superfície terrestre é composta por mares e oceanos nos quais habitam mais de 300 mil espécies de plantas e animais, o que representa um dos maiores reservatórios de biodiversidade do planeta. Por habitarem num ambiente altamente competitivo, os organismos marinhos desenvolveram mecanismos bioquímicos e fisiológicos que lhes permitem a sobrevivência da sua própria espécie. Esses mecanismos incluem a produção de metabolitos secundários cuja toxicidade não é tolerada pelos predadores, possibilitando a manutenção da espécie em ambiente de competição [34]. Desta forma, a maioria dos invertebrados marinhos, como as esponjas, os briozoários e os tunicados, são altamente dependentes de metabolitos secundários. Por outro lado, as mudanças drásticas ao nível das condições de pressão, temperatura, salinidade, pH, ação das ondas e luminosidade são fatores ambientais que podem desencadear o metabolismo secundário dos organismos marinhos, com vista à adaptação e preservação da espécie. Os metabolitos secundários, produzidos como forma de adaptação química, adquiriram a designação de “produtos naturais marinhos” (PNM) ou, simplesmente, “péptidos marinhos”. Estas moléculas, constituídas pela união de vários aminoácidos através de ligações peptídicas, passaram a ter características estruturais distintas às dos organismos terrestres, devido à frequente incorporação de átomos halogénios da água do mar circundante na sua própria estrutura química. Este e outros fatores contribuem para a importância conferida ao ambiente marinho, como uma fonte de compostos naturais cujo potencial farmacológico deve ser analisado [1,2,34].



**Figura 3.1 – Organismos marinhos como fonte de PNM.** A maior proporção de PNM é isolada a partir de invertebrados marinhos, como esponjas, tunicados, corais moles, molúsculos, briozoários e peixes. Estes organismos demonstram grande diversidade de produtos naturais, incluindo alcaloides, terpenos, policétidos, entre outros. Adaptado de Beesoo *et al.* [1].

O ecossistema marinho é detentor de uma diversidade de espécies muito maior do que as áreas terrestres. No entanto, quando comparados com os produtos de origem terrestre, os PNM têm sido alvo de pouca investigação. Estabelecendo uma relação entre o espaço no planeta ocupado pelo meio aquático e pelo meio terrestre, dos 70% ocupados pelos oceanos existem cerca de 12% de espécies conhecidas (Figura 3.2). Até 1950, o ecossistema marinho não foi alvo de pesquisa de PNM devido às dificuldades de acesso aos organismos que habitam nas águas mais profundas, associadas ao défice de técnicas de extração e à falta de conhecimento inerente aos habitats marinhos. Deste modo, o investimento da indústria farmacêutica na investigação de produtos naturais terrestres foi sempre superior ao dos PNM [1,34,35].

Mais tarde, na década de 70, foi possível dar um grande passo na investigação dos péptidos marinhos. Tal facto deveu-se à implementação de ferramentas de mergulho seguras e ao desenvolvimento de instrumentos para o isolamento de produtos naturais produzidos por organismos marinhos. Os representantes primordiais desta área foram as algas e os invertebrados, que desde logo passaram a fazer parte de estudos no âmbito da química e da farmacologia [1,34,35].



**Figura 3.2 – Relação entre a % de superfície ocupada no planeta e o número de espécies conhecidas nos ecossistemas marinho e terrestre.** Embora os oceanos ocupem a maior % de superfície terrestre (70%), são conhecidas apenas cerca de 12% de espécies provenientes do ecossistema marinho. Em contrapartida, dos 30% de superfície ocupada pelo ecossistema terrestre são conhecidas 88% de espécies. Estes dados permitem afirmar a necessidade em investir na exploração do ecossistema marinho. Adaptado de Cheung *et al.* [35].

A descoberta dos microrganismos marinhos representa uma realidade inovadora para os estudos com produtos naturais. Este novo panorama tem por base a perspectiva de sustentabilidade associada à síntese química de péptidos marinhos em quantidade suficiente, para a empregabilidade nos ensaios pré-clínicos e clínicos. O largo espectro de atividade dos péptidos marinhos, que inclui propriedades antibacterianas, antivirais, antitumorais, antioxidantes, imunomoduladoras, analgésicas, entre outras, tem despertado lentamente o interesse da indústria farmacêutica. Cerca de 45% dos PNM foram isolados após o ano 2000, o que permite concluir que o foco dos investigadores nesta área é, ainda, recente [1,34-36].

A importância da aplicação de péptidos marinhos na terapia oncológica está relacionada com algumas das características dos próprios péptidos. É de destacar a sua maior seletividade para as células cancerígenas, a baixa relação dose/efeito e a probabilidade relativamente reduzida para o desenvolvimento de resistências, quando comparados com os compostos de origem terrestre. Os péptidos marinhos possuem

estruturas particulares e uma diversidade de alvos moleculares extraordinária, o que aumenta o potencial farmacológico e terapêutico associado a estas moléculas [36].

Atualmente, os estudos com vista a isolar metabolitos secundários bioativos, provenientes da atividade dos organismos marinhos, têm vindo a registar um aumento progressivo e representam um desafio à comunidade científica. No âmbito da União Europeia, está em curso um programa de incentivo à investigação científica do ecossistema marinho designado “Conhecimento do meio marinho 2020”, que teve início em 2014 e cujo término será em 2020. Adicionalmente, o programa *Blue growth: unlocking the potential of seas and oceans* (“Crescimento Azul: libertar o potencial dos mares e oceanos”), que decorreu entre 2014 e 2015, envolveu a atribuição de 38 milhões de euros para projetos com vista ao desenvolvimento de práticas inovadoras, para o apoio à identificação de vários organismos marinhos. Como exemplo, destacam-se as técnicas de extração, de identificação estrutural e do perfil bioativo dos compostos, bem como as estratégias de produção eficiente e de sustentabilidade ambiental [36,37].

Porém, as dificuldades associadas quer à extração como à síntese dos péptidos marinhos e o baixo rendimento obtido, a complexidade estrutural destas moléculas e os elevados custos experimentais constituem os principais obstáculos para o desenvolvimento de fármacos de origem marinha [7].

### **3.2 Tipos de péptidos marinhos**

Os péptidos são suscetíveis a variações consideráveis na sua estrutura química, em relação ao tamanho e complexidade. No entanto, é possível agrupar os péptidos marinhos de acordo com algumas semelhanças existentes, a nível da estrutura que serve de base à sua constituição. Desta forma, estão descritos três grupos de compostos: péptidos lineares que possuem, no máximo, vinte resíduos de aminoácidos e as respetivas modificações; péptidos mono-, bi- e tricíclicos, isto é, péptidos que contém respetivamente um, dois ou três anéis cíclicos na sua estrutura química; e polipéptidos com mais de vinte resíduos de aminoácidos, que podem tomar conformações semelhantes às estruturas secundárias e terciárias típicas das proteínas [4]. Por se tratar de um grupo pouco estudado em termos da sua bioatividade e pureza a nível químico, tendo características muito particulares, os polipéptidos com mais de vinte resíduos de

aminoácidos não serão abordados em pormenor, ao contrário dos péptidos lineares e dos péptidos cíclicos.

Adicionalmente, a designação “depsipéptido” é atribuída aos péptidos que possuem uma ou mais ligações amida que foram previamente substituídas pelo éster correspondente. Os depsipéptidos podem apresentar, também, estruturas lineares ou cíclicas. Muitos depsipéptidos contêm aminoácidos com modificações estruturais pós-tradução, como N- e O-metilação, ou aminoácidos que não estão presentes nas proteínas, nos quais os grupos amina e/ou ácido carboxílico não surgem ligados através do carbono  $\alpha$ . Estas modificações permitem aumentar o tempo de semi-vida química e biológica do péptido, prevenindo a sua degradação e melhorando a biodisponibilidade nos tecidos alvo. Por outro lado, a presença de heterociclos, como tiazóis e triazóis, constitui outra característica interessante encontrada nos péptidos marinhos. Este tipo de estrutura permite aumentar a estabilidade e rigidez dos péptidos sem, no entanto, se verificar perda da citotoxicidade e, conseqüentemente, da sua eficácia [4,38].

### **3.2.1 Péptidos lineares**

Os péptidos lineares são constituídos por uma cadeia linear de aminoácidos e encontram-se unidos entre si através de ligações peptídicas. Comparativamente aos péptidos cíclicos, os péptidos lineares são considerados com menor viabilidade e rentabilidade pela indústria farmacêutica. De facto, a maioria dos péptidos lineares que contém dois a dez aminoácidos apresenta uma estrutura extremamente flexível em solução. Esta flexibilidade deve-se à grande variedade de conformações adotadas pelo péptido, com vista a atingir o equilíbrio químico [4,38]. Contudo, entre o arsenal de conformações possíveis, apenas algumas apresentam as características químicas adequadas para se poderem ligar ao recetor farmacológico. Conseqüentemente, embora certas conformações sejam capazes de se ligar seletivamente ao recetor, outras podem ligar-se ao sítio ativo das enzimas proteolíticas. Desta forma, os péptidos lineares podem ser submetidos a um processo de ciclização, cujo objetivo é reduzir ao máximo as conformações específicas para as enzimas proteolíticas, aumentando aquelas que são seletivas para o alvo farmacológico. Porém, alcançar simultaneamente ambas as condições pode tornar-se um processo moroso e difícil de alcançar [38].

Muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de compreender as vantagens que a ciclização apresenta sob a atividade biológica dos péptidos lineares.

Nesse sentido, foram criadas bibliotecas de sequências lineares e, simultaneamente, péptidos cíclicos análogos aos péptidos lineares que são mais promissores. Na sua esmagadora maioria, os resultados demonstram vantagens na empregabilidade da ciclização uma vez que, após otimizados, os péptidos cíclicos manifestam maior seletividade para o seu alvo farmacológico [38]. Esta e outras vantagens da ciclização apresentam-se em detalhe no subcapítulo 3.2.2 Péptidos cíclicos.



**Figura 3.3 – Estratégias envolvidas na síntese de um péptido cíclico, com elevada afinidade para a ligação a um alvo molecular.** Em geral, a ciclização permite que o péptido seja mais facilmente otimizado e, conseqüentemente, demonstre maior seletividade para o alvo farmacológico. Adaptado de Roxin *et al.* [38].

### **3.2.2 Péptidos cíclicos**

Os péptidos cíclicos são cadeias polipeptídicas, cuja estrutura química é constituída pela conexão de vários átomos de carbono, de modo a formar um anel. A estrutura em anel pode ser constituída através da união de ambas as extremidades do péptido por meio de uma ligação amida, ou outras ligações quimicamente estáveis como as lactonas, éteres, tioéteres e bissulfuretos [35,39,40].

Comparativamente aos péptidos lineares, existe uma maior diversidade de péptidos marinhos cíclicos com atividade citotóxica. A variabilidade estrutural deve-se às diferentes vias biossintéticas a partir dos quais os péptidos cíclicos podem ter origem, seja pela via ribossomal ou pela via não ribossomal (*vide* Capítulo IV: Vias biossintéticas dos péptidos marinhos) [4,38,39]. De facto, pequenas variações estruturais podem refletir-se em diferenças significativas na atividade biológica dos péptidos. Como exemplo, é de referir que a substituição de um resíduo de lactil-prolina, existente no péptido didemmina B, por um resíduo de piruvoilprolina, origina um composto designado plitidepsina, com uma atividade citotóxica mais potente que o péptido original [40,41].

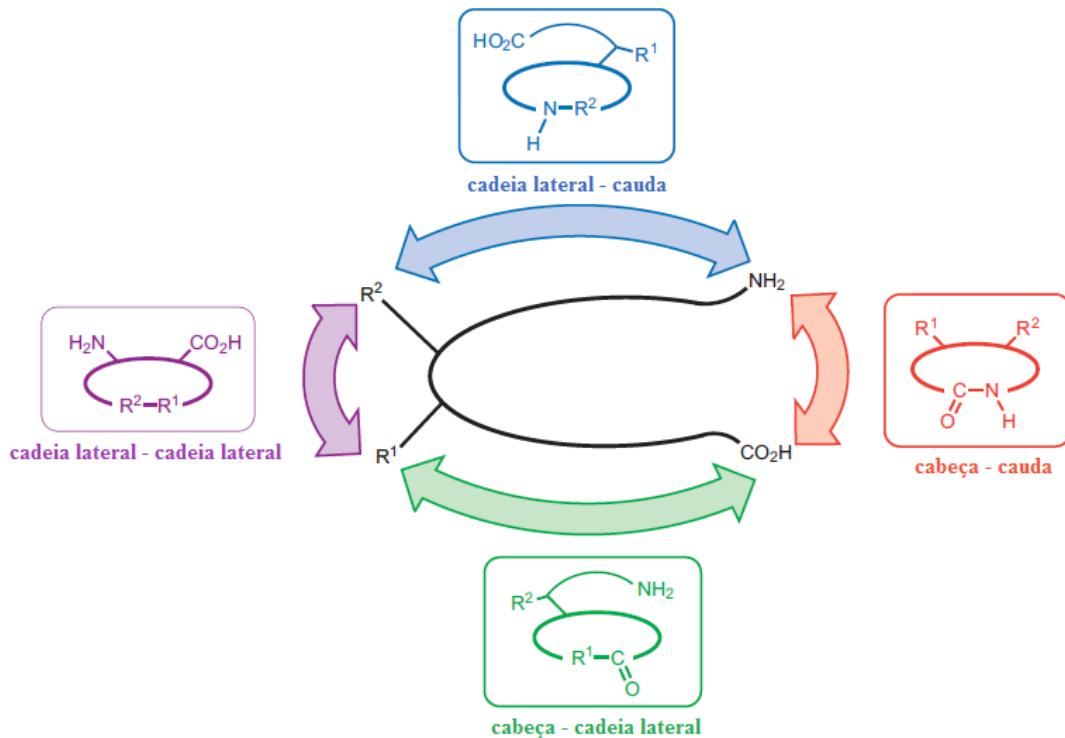
Por outro lado, além da diversidade em estruturas químicas, os péptidos cíclicos apresentam vantagens adicionais aos péptidos lineares. Uma das vantagens de maior interesse prende-se com a resistência dos péptidos cíclicos à hidrólise por proteases endógenas e exógenas. De facto, a formação de ciclos reduz a liberdade conformacional da cadeia polipeptídica, permitindo a formação de um péptido com menor flexibilidade e, por isso, mais resistente à hidrólise. Consequentemente, os péptidos cíclicos são, em geral, mais estáveis e possuem um interesse terapêutico superior, uma vez que representam fármacos com melhor atividade biológica e, por isso, maior eficácia. Em termos termodinâmicos, a rigidez dos péptidos cíclicos diminui o valor de entropia associado à energia livre de Gibbs, permitindo aumentar a força de ligação às moléculas alvo, bem como a seletividade em relação ao recetor molecular [39,42].

### **3.2.2.1 Vias de ciclização**

Tendo em conta o arsenal de vantagens associadas aos péptidos cíclicos, a maioria dos péptidos que são sintetizados a nível laboratorial são, posteriormente, submetidos a um processo de ciclização. Para além dos aspetos anteriormente mencionados, o processo de ciclização permite aumentar a hidrofobicidade dos homólogos lineares, potenciando a estabilidade dos compostos e a sua seletividade em relação ao alvo farmacológico [43].

De acordo com o tipo de ligação que une os dois aminoácidos responsáveis pela formação do anel cíclico, os péptidos cíclicos podem ser classificados em duas categorias diferentes. Desta forma, a designação “péptidos homodéticos” é atribuída quando as ligações responsáveis pela ciclização da estrutura são apenas ligações peptídicas normais, isto é, entre resíduo  $\alpha$ -carboxilo de um aminoácido e o resíduo  $\alpha$ -amina de outro. Por outro lado, os péptidos heterodéticos são aqueles nos quais as ligações entre os aminoácidos responsáveis pela formação do anel cíclico são estabelecidas por meio de grupos funcionais diferentes [43,44]. A Figura 3.4 sumariza as principais estratégias de ciclização dos péptidos, que se baseiam em [43,44]:

- a. Ciclização cabeça – cauda: a ligação peptídica é estabelecida entre a extremidade N-terminal do grupo amina e a extremidade C-terminal do grupo carboxilo, o que permite a união de ambas as extremidades do péptido;
- b. Ciclização cadeia lateral – cauda: a ligação peptídica ocorre entre a extremidade N-terminal do grupo amina e um dos grupos substituintes da cadeia de aminoácidos;
- c. Ciclização cadeia lateral – cadeia lateral: ocorre quando a ligação peptídica é estabelecida entre duas cadeias laterais de aminoácidos;
- d. Ciclização cabeça – cadeia lateral: trata-se de uma ligação formada através da união entre a extremidade C-terminal do grupo carboxilo e uma das cadeias laterais de aminoácidos.



**Figura 3.4 – Tipos de ciclização de péptidos.** A estratégia mais utilizada é a ciclização cabeça – cauda. No entanto, as ciclizações cadeia lateral – cadeia lateral, cabeça – cadeia lateral e cadeia lateral – cauda são igualmente úteis e importantes. Na figura, as letras R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> representam duas cadeias laterais de aminoácidos. Adaptado de White *et al.* [44].

### 3.3 Péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica

Desde a década de 50 até aos dias de hoje, são muitos os péptidos, quer de estrutura linear como cíclica, que têm sido identificados em várias espécies de organismos marinhos. Atualmente, conhecem-se mais de uma centena de péptidos diferentes com aplicação na terapia oncológica, alguns dos quais encontram-se em várias fases de ensaios clínicos, com vista ao estudo de propriedades como a eficácia e a segurança. Outros, embora em menor número, já obtiveram aprovação por parte das autoridades competentes, como a FDA e a EMA, e são comercializados em vários países para o tratamento de diversos tipos de tumores [35]. A tabela seguinte contém alguns dos péptidos de estrutura linear e cíclica e a respetiva aplicação na terapia oncológica, bem como a fonte marinha a partir do qual são obtidos.

**Quadro 3.1 – Péptidos marinhos lineares e cíclicos, fonte a partir do qual são obtidos e respetiva aplicação na terapia oncológica.** Adaptado de Varela *et al.* [4].

Péptidos lineares				
Nome do péptido	Fonte			Aplicação
	Espécie	Filo	Família	
<b>Dolastatina 10<sup>a</sup></b>	<i>Dolabella auricularia</i>	Mollusca	Aplysiidae	Tumores do pâncreas, rim, mama e pulmão e próstata
<b>Dragonamida A, C-D</b>	<i>Lyngbya sp.</i>	Cyanobacteria	Oscillatoriaceae	Tumores sólidos
<b>Hemiasterlina</b>	<i>Hemiasterella minor</i>	Porifera	Hemiasterellidae	Tumores sólidos, em especial cancro do pâncreas
	<i>Auletta sp.</i>		Axinellidae	
	<i>Siphonochalina sp.</i>		Callyspongiidae	
Péptidos cíclicos				
<b>Briostatina 1</b>	<i>Bugula neritina</i>	Bryozoa	Bugulidae	Leucemias, linfomas e tumores do pâncreas, ovário, mama, próstata, cabeça e pescoço
<b>Citarabina</b>	<i>Tethya crypta</i>	Porifera	Tethyidae	Leucemia aguda não linfocítica
<b>Didemnina B<sup>b</sup></b>	<i>Trididemnum solidum</i>	Chordata	Didemnidae	Leucemias e linfomas
<b>Kahalalido F<sup>c</sup></b>	<i>Elysia rufescens</i>	Mollusca	Plakobranchidae	Melanoma e carcinoma hepatocelular
<b>Halicondrina B</b>	<i>Halichondria okadaï.</i>	Porifera	Halichondriidae	Cancro da mama
<b>Hemiasterlina<sup>d</sup></b>	<i>Hemiasterella minor</i>	Porifera	Hemiasterellidae	Cancro da próstata
<b>Pahayokolido A</b>	<i>Lyngbya sp.</i>	Cyanobacteria	Oscillatoriaceae	Tumores do pulmão, ovário e rim

<sup>a</sup>Atualmente, considera-se que a fonte atual do péptido são as cianobactérias ingeridas pelo molúsculo, dos géneros *Lyngya* e *Symploca*.

<sup>b</sup>Atualmente, considera-se como verdadeira fonte do péptido a cianobactéria simbiote *Synechocystis trididemni*.

<sup>c</sup>Atualmente, considera-se que a fonte atual do péptido são as cianobactérias ingeridas pelo molúsculo, do género *Bryopsis*.

<sup>d</sup>Este péptido pode igualmente ser encontrado em esponjas dos géneros *Cymbastela*, *Auletta* e *Siphonochalina*.

## **Capítulo IV: Vias biossintéticas dos péptidos marinhos**

A síntese de péptidos compreende duas vias distintas: ribossomal e não ribossomal. A via ribossomal exige a presença de uma estrutura não membranar, o ribossoma, que permite a síntese de péptidos através da informação veiculada pelo RNA mensageiro (mRNA) [45]. Por outro lado, a via não ribossomal dispensa a utilização dos ribossomas, recorrendo a enzimas designadas policétidos-sintases. Estas enzimas sintetizam os péptidos mediante um processo que reúne várias etapas e necessita de moléculas precursoras de acetil-coenzima A (acetil-CoA) [46].

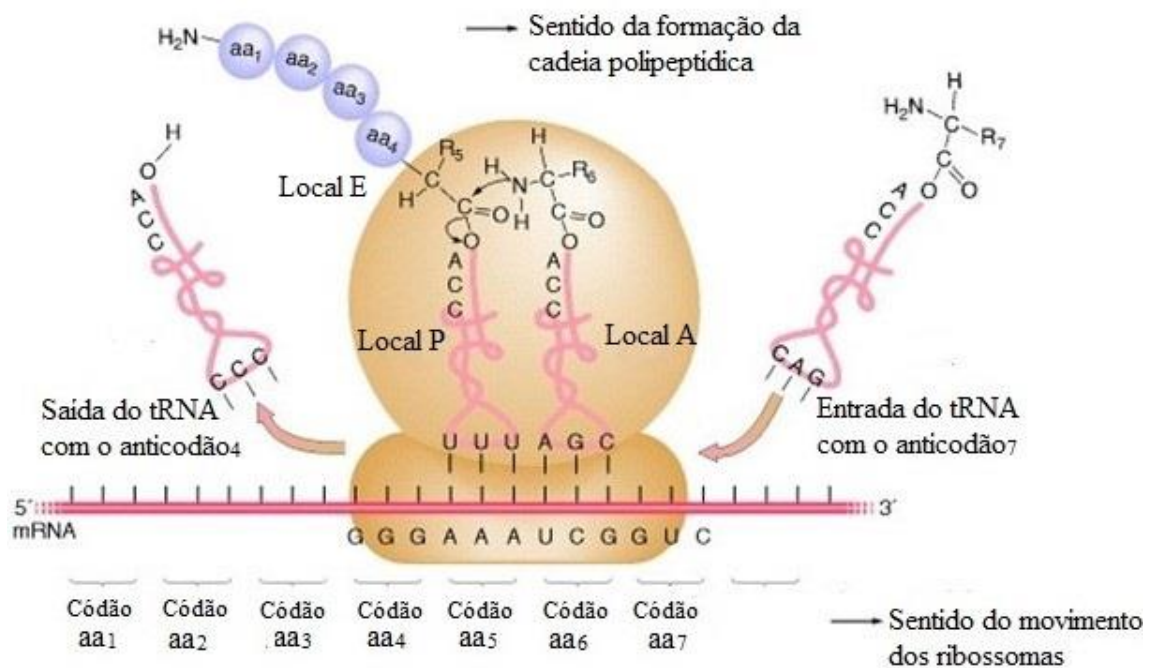
### **4.1 Via ribossomal**

Os péptidos ribossomais são sintetizados através de um mecanismo designado síntese proteica. Este processo é altamente dependente da presença de ribossomas e divide-se em duas fases distintas: transcrição e tradução [45].

A tradução é a designação atribuída ao processo a partir do qual ocorre a leitura da mensagem contida na molécula de mRNA pelos ribossomas. Este processo permite a descodificação da informação contida no mRNA, com origem na formação de um péptido. A tradução pode ser dividida em três fases fundamentais designadas iniciação, alongação e terminação. A tradução inicia-se com a formação de um complexo de iniciação, a nível do codão de iniciação (como por exemplo, AUG). Este complexo consiste na cadeia de mRNA, num RNA transferência (tRNA) com o anticodão complementar (5'-CAU-3'), que transporta o primeiro aminoácido (metionina), e na subunidade 40S do ribossoma. Nos eucariotas, o tRNA inicial é posicionado na subunidade ribossomal 40S, por meio do fator de iniciação eEF1A, ainda antes da ligação ao mRNA [47].

A alongação tem início quando o anticodão do segundo aminoacil-tRNA, isto é, um tRNA carregado com um aminoácido de acordo com o código genético da célula, encontra a sequência complementar no codão do mRNA respetivo. Este processo é dependente de GTP (guanosina trifosfato) e, mais uma vez, de fatores de alongação (eEFs). A ligação de GTP ao eEF1A permite ativar a alongação, através da mudança de conformação deste fator, e desencadeia o recrutamento de aminoacil-tRNA. Simultaneamente, o primeiro tRNA é deslocado para o local P (peptidilo) do ribossoma,

sendo posteriormente libertado através do local E (de saída). O ribossoma desloca-se, em seguida, a uma distância equivalente a um triploto em relação ao mRNA, permitindo a exposição do codão seguinte e o recrutamento de um novo aminoacil-tRNA no local A (aminoacilo). A terminação da síntese da cadeia peptídica ocorre quando surge um dos codões de terminação (UAA, UAG e UGA), a nível do local A. Uma vez que não existe correspondência de nenhum dos aminoácidos para cada um dos três codões referidos, a síntese proteica é, então, terminada [48,49].



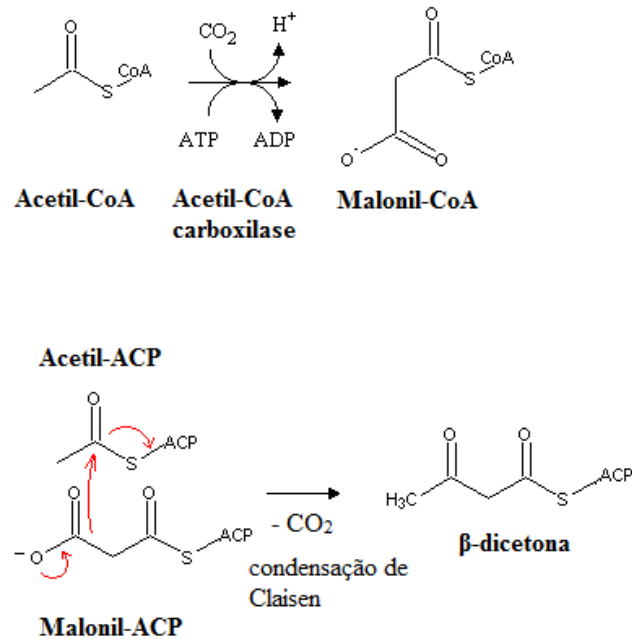
**Figura 4.1 – Elongação da tradução.** Este processo compreende o posicionamento de sucessivas moléculas de tRNA na subunidade 40S do ribossoma. As duas subunidades do ribossoma contêm três locais adjacentes, que constituem os sítios de ligação às moléculas de tRNA: locais aminoacilo (A), peptídico (P) e de saída (E). No decorrer da tradução, as moléculas de tRNA ligam-se, numa fase inicial ao local A, sendo posteriormente deslocadas para o local P e, no final, para o local E. Adaptado de Fixsen *et al.* [50].

## 4.2 Via não-ribossomal (policétidos sintases)

A descoberta do primeiro policétido, o orcionol, remonta ao ano de 1893 e foi conseguida pelos investigadores Collie e Myers. Durante alguns anos, afirmou-se que este composto era sintetizado por reações sucessivas de condensação ou de polimerização. No entanto, estudos posteriores permitiram descobrir uma nova classe química designada “policétidos”. Esta classe englobava os compostos caracterizados pela ocorrência de um “motivo” (-CH<sub>2</sub>-CO), à qual Collie designou de “cétido”. Anos mais tarde, em 1953, Birch e Donovan sugeriram uma nova via de biossíntese para os policétidos, que em muito se assemelhava à via biossintética dos ácidos gordos. Os avanços em diversas técnicas de extração de material genético, como DNA recombinante, enzimas de restrição, técnicas de sequenciação e PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase), entre a década de 60 e 80, possibilitaram analisar a base genética da biossíntese de policétidos [51,52].

Atualmente, os policétidos são caracterizados como uma classe de metabolitos secundários, produzidos por microrganismos como fungos e bactérias. Estes compostos são biosintetizados a partir de precursores de acetil-CoA, através de enzimas designadas policétidos-sintases (PKSs). Ao contrário dos ribossomas, as PKSs não necessitam de RNA mensageiro para a produção de um péptido e, por isso, os policétidos são considerados péptidos não ribossomais [46].

De um modo geral, quer a biossíntese de policétidos como a de ácidos gordos ocorre a partir de uma molécula de acetil-CoA. Como se tratam de processos endergónicos, a molécula de acetil-CoA deve ser previamente ativada, mediante uma carboxilação. Esta reação ocorre a partir da enzima acetil-CoA carboxilase e permite a transformação de acetil-CoA em malonil-CoA. Posteriormente, o malonil é transferido para uma proteína transportadora de acetilos (ACP), dando origem a uma molécula de malonil-ACP. A molécula será então condensada, por meio de uma condensação de Claisen, com acetil-ACP (sintetizada de forma semelhante a partir de acetil-CoA). A condensação de Claisen é, por sua vez, uma reação química que ocorre entre dois ésteres e uma cetona, na presença de uma base forte, permitindo a formação de um β-ceto-éster ou uma β-dicetona [46,52].

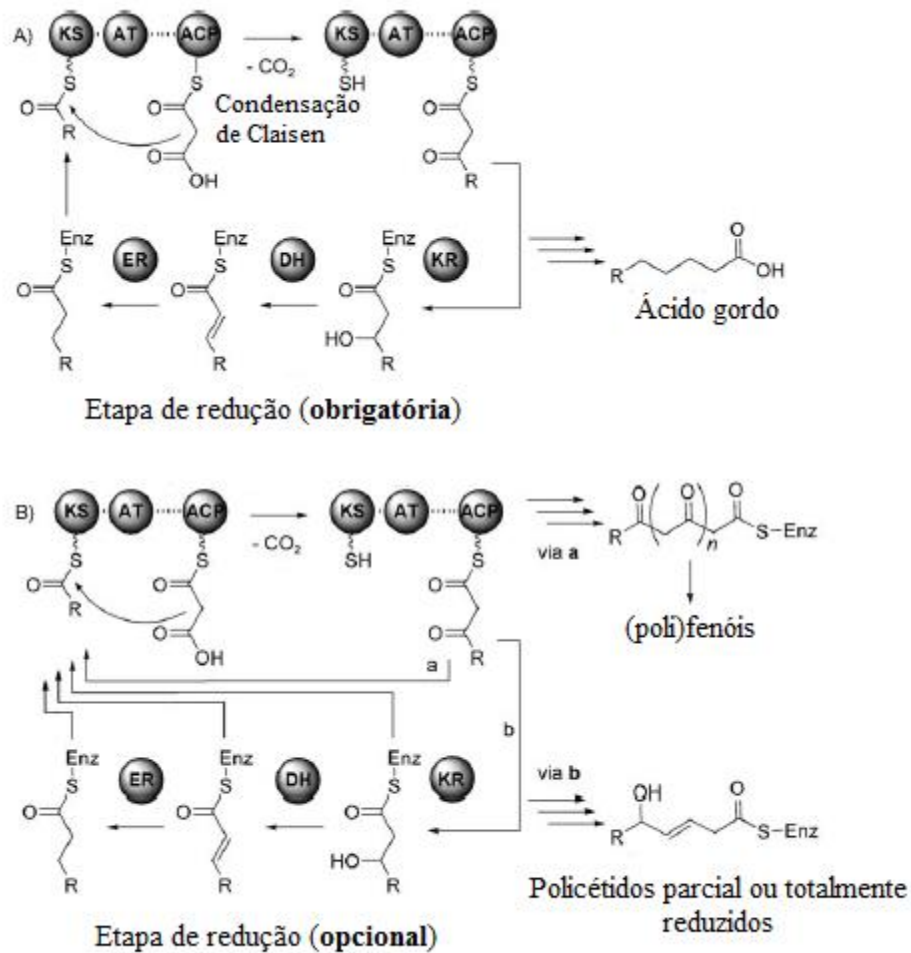


**Figura 4.2 – Princípios básicos da biossíntese de ácidos gordos e policétidos.** Adaptado de Hertweck [52].

Cada enzima policétido-sintase é constituída por três domínios funcionais diferentes, necessários para a síntese e crescimento da cadeia do policétido. O domínio aciltransferase (AT) permite selecionar e ativar o substrato apropriado para a síntese do novo composto. O domínio cetosintase (KS) junta-se ao precursor previamente selecionado pela AT e catalisa a reação de alongação da cadeia polipeptídica, a partir de reações de condensação (do tipo Claisen). A proteína transportadora de grupos acetilos permite o transporte do substrato com o grupo acetil, participando na alongação da cadeia. Adicionalmente, podem ser encontrados outros domínios entre AT e ACP como os domínios cetorredutase (KR); desidratase (DH); e enoil redutase (ER). Estas estruturas possuem a capacidade de modificar a unidade acetil após a sua condensação. Habitualmente, as PKS podem ainda conter um outro módulo, tioesterase (TE), responsável pela ciclização da cadeia polipeptídica final. O domínio TE encontra-se, habitualmente, no final da cadeia modular da PKS. Neste sentido, o policétido pode sofrer modificações pós-síntese tais como metilação, ciclização, alquilação e glicosilação. Estes domínios adicionais conferem às PKS a capacidade de gerar uma diversidade considerável de estruturas moleculares [51,52].

Apesar das semelhanças estruturais e funcionais encontradas entre as vias biossintéticas de ácidos gordos e de policétidos, existe um conjunto de características que

possibilita a sua distinção. As PKS diferem claramente das sintases de ácidos gordos (SAG) na capacidade em utilizar uma gama mais ampla de moléculas iniciadoras da síntese e de unidades de extensão. Consequentemente, esta particularidade permite a formação de cadeias polipeptídicas com vários comprimentos. Por outro lado, ao contrário da biossíntese de ácidos gordos, na qual ocorre a terminação da cadeia molecular após cada alongamento através de uma redução, na biossíntese de policétidos as etapas redutoras antes do próximo alongamento podem ou não ocorrer. Esta característica confere aos policétidos uma elevada complexidade química. Adicionalmente, os policétidos são normalmente libertados sob a forma de moléculas cíclicas, enquanto os ácidos gordos são terminados sob a forma de ácido carboxílico linear [46,51,52].



**Figura 4.3 – Principais diferenças entre a via biossintética de ácidos gordos e de policétidos.** A) Via biossintética de ácidos gordos. B) Via biossintética de policétidos. É de notar que a etapa de redução apresenta um carácter obrigatório após o alongamento da cadeia, na síntese de ácidos gordos. Pelo contrário, na síntese de policétidos esta etapa é opcional, pelo que o policétido formado pode encontra-se parcial ou totalmente reduzido. Adaptado de Hertweck [52].

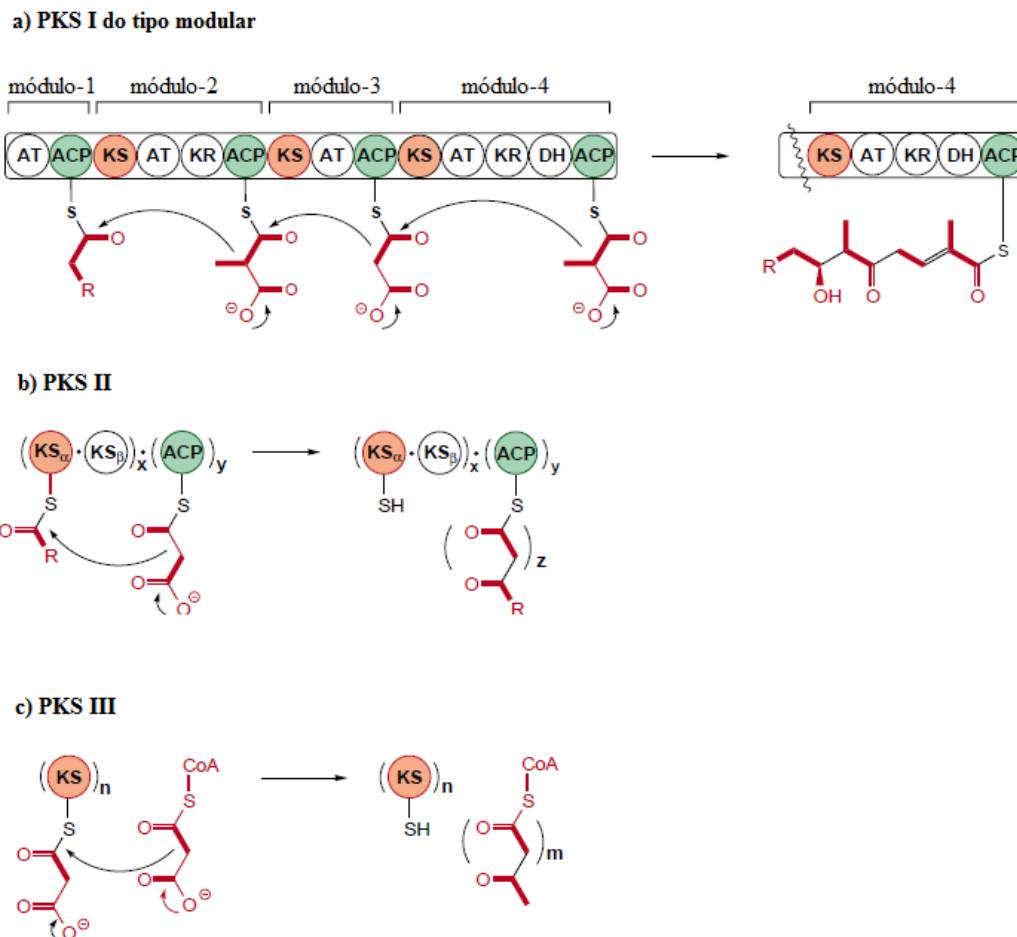
Atualmente, são conhecidos três tipos de poliketidos-sintases, designadamente PKS do tipo I, II e III. Por sua vez, as PKS I podem ser do tipo modular, encontradas geralmente em bactérias, ou do tipo iterativo, existentes predominantemente em fungos. As PKS I modulares são enzimas multifuncionais organizadas em módulos. Cada módulo engloba um conjunto completo de domínios independentes, responsável por um ciclo de alongamento da cadeia policetídica, catalisando apenas uma reação em todo o processo [51].

As PKS I do tipo iterativo utilizam os mesmos domínios que as PKS I modulares; no entanto, cada sítio ativo engloba os vários domínios, que são usados repetidamente de forma a processar o alongamento da cadeia do poliketido. Quando comparadas às PKS I modulares, estas sintases apresentam menor tamanho e consistem em complexos de enzimas mono-funcionais. Embora inicialmente se pensasse que a existência destas enzimas estaria limitada aos fungos, as PKS I iterativas têm sido recentemente encontradas em algumas espécies de bactérias. Além disso, Shen, Müller e Wilkison encontraram vestígios de módulos exclusivos das PKS modulares em PKS iterativas, tendo-se verificado que estes funcionavam repetidamente, para incorporar unidades de extensão adicionais na cadeia policetídica pré-sintetizada. Consequentemente, a definição de PKS I do tipo iterativo bem como o seu modo de ação constituem questões atualmente em estudo e expansão [46,51].

As poliketidos-sintases do tipo II contém domínios catalíticos semelhantes aos existentes nas PKS I. No entanto, as PKS II tipicamente apresentam dois domínios KS:  $KS_{\alpha}$  e  $KS_{\beta}$ . O primeiro é equivalente ao KS encontrado nas PKS do tipo I, enquanto o segundo exerce o controlo do comprimento da cadeia policetídica. Por outro lado, os poliketidos produzidos por este tipo de enzimas apenas sofrem redução aquando da sua síntese total, e posterior libertação pelas PKS II. Estas enzimas atuam de forma coordenada na formação da estrutura principal do poliketido, que pode apresentar um tamanho variável, e catalisam a formação de compostos que requerem a aromatisação e ciclização [46,51].

Por último, à semelhança das PKS I e das PKS II, as PKS III condensam a molécula inicial com uma série de unidades de extensão, de modo a dar origem a uma cadeia de poliketido. No entanto, as PKS III carecem de vários domínios catalíticos e utilizam um mecanismo de extensão da cadeia independente de ACP, que permite às enzimas atuar diretamente sob os substratos de acetil-CoA [46,51].

Apesar das diferenças em termos estruturais e mecânicos, todos os tipos de PKS biossintetizam policétidos por condensação descarboxilativa dos precursores de acetil-CoA. A síntese de policétidos constitui uma via diversificada que se deve, sobretudo, à multiplicidade de unidades iniciadoras da síntese; às variações no número de unidades de extensão incorporadas; às alterações no estado de oxidação do policétido sintetizado; e, por último, às várias possibilidades de terminação da cadeia [51,52].



**Figura 4.4 – Estruturas e mecanismos das PKS do tipo I (modular), II e III.** Adaptado de Weissman [46].

## **Capítulo V: Péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica em fase de ensaios clínicos**

### **5.1 Ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos de Fase I, II e III**

De acordo com o INFARMED, I.P., os ensaios clínicos são estudos conduzidos no Homem, destinados a descobrir ou verificar os efeitos de um ou mais medicamentos experimentais [53].

À semelhança de outras substâncias químicas, o processo de estudo de compostos marinhos com propriedades antitumorais é complexo e requer o envolvimento de múltiplas etapas. De facto, embora se verifique um reduzido número de fármacos aprovados pela FDA e pela EMA, são centenas as substâncias que se encontram em diferentes fases de ensaios pré-clínicos e clínicos. Consequentemente, a estatística dita que, entre 5000 substâncias que iniciam um estudo pré-clínico, apenas 5 passam aos ensaios clínicos e apenas 1 irá resultar num fármaco com aplicação clínica. Por outro lado, além dos elevados custos económicos associados ao decorrer do ensaio clínico, o fator tempo é igualmente considerável. O processo é, de facto, bastante moroso, cuja duração mínima reúne um total de 15 anos, desde a descoberta da molécula de interesse até à comercialização da mesma [7,54].

Porém, é importante ter em conta que, mesmo as substâncias que não são aprovadas após a realização do respetivo ensaio, ofereceram um contributo positivo no que toca à evolução das investigações, por meio da avaliação da relação estrutura e atividade farmacológica, com vista à otimização dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e à eliminação da toxicidade associada. [7].

O Quadro 5.1 ilustra as diversas fases de um ensaio clínico, bem como o respetivo tempo associado e os alvos de estudo de cada uma delas.

**Quadro 5.1 – Etapas envolvidas no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.** Adaptado de Costa-Lotufo *et al.* [7]

Descoberta		Ensaio Pré-Clinico		Ensaio Clínico		Aprovação
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	
5000 substâncias (Protótipo)	Testes <i>in vitro</i>	Testes <i>in vivo</i>	Eficácia terapêutica	Demonstração/confirmação do benefício terapêutico	Pós-AIM	
	Farmacodinâmica		Perfil de segurança a curto prazo	Eficácia Segurança	Monitorização Pós-Marketing	
	Farmacocinética		Determinação da dose - resposta	Obtenção de AIM (Autorização de Introdução no Mercado)	Avaliação de interações medicamentosas e de efeitos adversos adicionais	
	Toxicologia					
(Protótipo Otimizado)						
3-5 anos	3 anos	6 anos			3 anos	

## 5.2 Péptidos marinhos em ensaios clínicos e aprovados para a terapia oncológica

A FDA aprovou o primeiro péptido de origem marinha para aplicação na terapia oncológica, a Citarabina (Ara-C), em 1969. Este marco permitiu a expansão e o desenvolvimento de diversos esquemas terapêuticos, em torno deste tipo de compostos. Devido à enorme variabilidade estrutural dos produtos naturais, entre 1980 e 2006, verificou-se que cerca de 28% dos fármacos aprovados pela FDA, com vista ao tratamento do cancro, tinham origem natural ou eram inspirados em produtos naturais. No entanto, embora se verifique um número relativamente reduzido de fármacos baseados em péptidos marinhos aprovados, são muitos os compostos que se encontram em diversas fases de ensaios clínicos (Quadro 5.2). Por outro lado, mesmo os compostos aprovados pela FDA continuam a ser submetidos a estudos clínicos, com o objetivo de sustentar os resultados relativos à sua eficácia e segurança e, ainda, alargar o arsenal de aplicações terapêuticas para os quais estes demonstram ter aplicabilidade [4,7].

Os conteúdos que se seguem contêm informação detalhada sobre alguns dos fármacos que já obtiveram aprovação pela FDA e pela EMA, como a trabectedina e o brentuximab vendotina, mas que estão igualmente sujeitos a ensaios clínicos. Encontram-se, também, descritos os péptidos auristatina e dolastatina, precursores do fármaco brentuximab vendotina. Adicionalmente, apresentam-se em destaque os péptidos

didemnina B e plitidepsina, dois análogos químicos que permitiram o desenvolvimento da Aplidina® [55]. A escolha destes péptidos teve como base vários critérios, que incluem não só a quantidade de literatura disponível, como também a pertinência da mesma. No que toca aos fármacos já aprovados, a seleção dos péptidos marinhos inclui a vasta aplicabilidade e a taxa de sucesso que estes apresentam para a terapia oncológica, comparativamente a outros péptidos marinhos com propriedades antitumorais. Por outro lado, o número de publicações relativas a resultados de ensaios clínicos, já terminados, adquire um papel importante para a clarificação destes compostos. Relativamente aos péptidos que se encontram em ensaios clínicos e ainda não foram aprovados pelas entidades competentes, a seleção baseia-se na quantidade de estudos em curso para o aperfeiçoamento destes compostos. Embora apresentem algumas particularidades, estes estudos permitem aprofundar o conhecimento relativo à eficácia e segurança dos péptidos marinhos, de modo a que a aprovação no âmbito da aplicabilidade relativa a cada um deles se torne possível.

**Quadro 5.2 – Péptidos marinhos em ensaios clínicos de Fase I, II e III e aprovados pela FDA para o tratamento de patologias oncológicas.** De notar que, os compostos listados não englobam a totalidade de péptidos marinhos que, atualmente, se encontram em ensaios clínicos. Adaptado de *Marine Pharmacology* [56].

<b>Fase do ensaio clínico</b>	<b>Nome do péptido</b>	<b>Marca comercial</b> (ano de aprovação pela FDA)	<b>Organismo marinho</b>	<b>Classe química</b>	<b>Alvo molecular</b>	<b>Aplicação</b>
Fase I	ABBV-085 ABBV-399 ABBV-221 ABBV-838	NA	Molusco/ cianobactérias	Anticorpo conjugado com MMAF	Vários, em especial EGFR e microtúbulos	Tumores sólidos
	Briostatina	NA	Briozoários	Lactona macrólida	Proteína C cinase	Cancros do pâncreas, próstata, estômago, rim, pulmão e das trompas de Falópio, leucemias e melanomas
	GSK2857916	NA	Molusco/ cianobactérias	Anticorpo conjugado com MMAF	Antigénio de maturação dos linfócitos B	Mieloma múltiplo

<b>Fase do ensaio clínico</b>	<b>Nome do péptido</b>	<b>Marca comercial</b> (ano de aprovação pela FDA)	<b>Organismo marinho</b>	<b>Classe química</b>	<b>Alvo molecular</b>	<b>Aplicação</b>
Fase I	Salinosporamida A	NA	Bactérias	$\beta$ - Lactona	Proteossoma 20S	Cancro do pulmão de células não pequenas, cancro do pâncreas, melanoma, linfoma e mieloma múltiplo
Fase II	ABT-414 EGFRvIII - MMAF	NA	Molusco/ cianobactérias	Anticorpo conjugado com MMAF	EGFR e microtúbulos	Cancro da mama e melanomas metastáticos
	Lurbinectedina	NA	Tunicado	Alcalóide	Sulco menor do DNA	Cancros do ovário, mama, pulmão, endométrio e leucemia aguda
	SGN-CD19A	NANA	Molusco/ cianobactérias	Anticorpo conjugado com MMAF	CD-19 e microtúbulos	Diversos tipos de linfomas
Fase III	Plinabulina	NA	Fungo	Diketopiperazine	Microtúbulos	Cancro do pulmão de células não pequenas e tumores cerebrais
	Plitidepsina	Aplidina®	Tunicado	Depsi-péptido	Rac1 e ativação da c-JNK	Mieloma múltiplo e leucemias linfocíticas
Aprovado pela FDA	Auristatina	Adcetris® (2011)	Molusco/ cianobactérias	Anticorpo conjugado com MMAE	CD-30 e microtúbulos	Linfoma anaplásico de grandes células e linfoma de Hodgkin
	Citarabina	Cytosar-U® (1969)	Esonja	Nucleótido	DNA Polimerase	Leucemia
	Mesilato de erubilina	Halaven® (2010)	Esonja	Macrólido	Microtúbulos	Cancro da mama metastático

Fase do ensaio clínico	Nome do péptido	Marca comercial (ano de aprovação pela FDA)	Organismo marinho	Classe química	Alvo molecular	Aplicação
Aprovado pela FDA	Trabectedina	Yondelis® (2015)	Tunicado	Alcaloide	Sulco menor do DNA	Sarcoma dos tecidos moles e cancro do ovário

Legenda: **EGFR** – *Epidermal growth factor receptor* (recetor do fator de crescimento epidérmico); **NA** – Não Aprovado; **MMAE** – Monometil-auristatina E; **MMAF** - Monometil-auristatina F.

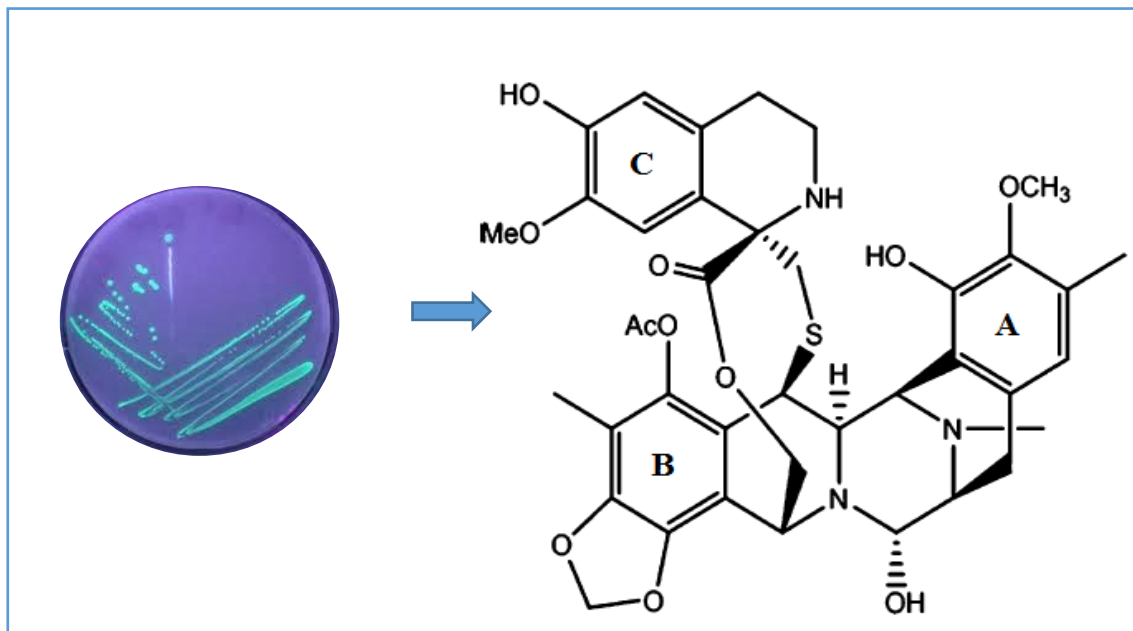
### 5.3 Trabectedina

A trabectedina (Yondelis®, ET-743) é um alcaloide tetrahydroisoquinoloide, identificado em 1960, através de uma investigação levada a cabo pelo Instituto Nacional do Cancro dos Estados Unidos da América (*National Cancer Institute* – NCI). Inicialmente, os estudos referiam o tunicado marinho *Ecteinascidia turbinata* (Figura 5.1), frequentemente encontrado nos mares das Caraíbas e do Mediterrâneo, como a fonte de origem do péptido. Contudo, mais tarde veio a descobrir-se que o verdadeiro organismo responsável pela biossíntese da trabectedina é a bactéria *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*, que constitui um microrganismo simbiote do tunicado. Em consequência do interesse terapêutico demonstrado pelo composto e de forma a respeitar a dinâmica do ecossistema marinho, a empresa farmacêutica *PharmaMar* desenvolveu um método de síntese química da trabectedina. Este método pressupõe o recurso a cianosafracina B, um antibiótico proveniente da fermentação de culturas da bactéria *Pseudomonas fluorescens* [7,57].

A estrutura molecular da trabectedina (Figura 5.2) evidência um péptido cíclico e que possui três anéis tetrahydroisoquinoloides fundidos [58].



**Figura 5.1 – *Ecteinascidia turbinata*.** Os tunicados pertencem ao filo Urochordata e englobam cerca de 1250 espécies de organismos marinhos. Cada indivíduo da colónia, zooide, pode atingir cerca de 2,5 cm de comprimento. Os zooides estão unidos na base, através de uma estrutura semelhante a um caule, que permite a circulação sanguínea e a fixação da colónia ao substrato. A coloração laranja deve-se à deposição de carotenoides e constitui um alerta para os possíveis predadores, fazendo com que estes se afastem desta espécie devido à sua toxicidade. Adaptado de Manning *et al.* [59].



**Figura 5.2 – Estrutura química da trabectedina e respetiva bactéria (*Pseudomonas fluorescens*) a partir da qual o péptido é, atualmente, obtido pela empresa *PharmaMar*.** A trabectedina é um péptido cíclico, constituído por 3 anéis tetrahydroisoquinoloides, representados pelas letras A, B e C. Esta substância é constituída predominantemente por átomos de carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto, tratando-se de um péptido de carácter básico que o permite caracterizar como alcaloide. Adaptado de Larsen *et al.* [60].

A trabectedina foi um dos primeiros péptidos de origem marinha a ser aprovado pela EMA, em 2007, para o tratamento de pacientes com sarcomas dos tecidos moles, sendo atualmente um fármaco citotóxico usado em mais de 70 países. Dois anos depois, em 2009, este péptido foi aprovado para uma nova indicação terapêutica, desta vez com aplicação no tratamento do cancro do ovário recidivante e sensível a compostos contendo platina, em combinação com doxorrubicina lipossomal peguilhada (PLD). No entanto, devido à toxicidade manifestada a nível hepático, aquando do tratamento com o péptido, a trabectedina foi apenas autorizada pela FDA em 2015. Esta autorização destinou-se ao tratamento de leiomiossarcomas e lipossarcomas, após falha terapêutica de um regime posológico contendo antraciclina e ifosfamida, ou em doentes para os quais estes fármacos não são apropriados. Além disso, decorrem ensaios clínicos de Fase II com vista à aprovação da trabectedina em cancros do pulmão, mama e próstata [8,58].

De facto, o resultado de vários ensaios clínicos levados a cabo com vista à comprovação da eficácia da trabectedina demonstram que o fármaco possui a capacidade de diminuir o crescimento tumoral, em aproximadamente 50% dos doentes analisados. Adicionalmente, o fármaco produziu também um aumento estatisticamente significativo do tempo decorrente até à progressão do tumor [61].

Os primeiros ensaios clínicos levados a cabo com trabectedina apresentaram severa toxicidade, chegando mesmo a provocar algumas mortes. Entre as principais reações adversas descritas destacam-se a neutropenia, aumento das transaminases e rabdomiólise. Posteriormente, vários estudos foram desenvolvidos com vista à perceção dos efeitos adversos relacionados com a toxicidade, bem como para o eventual ajuste de doses, processo que tornou a progressão normal dos ensaios clínicos mais morosa. Atualmente, graças a várias modificações adotadas que melhoraram substancialmente o perfil toxicológico do fármaco, aponta-se apenas como principais reações adversas a neutropenia e o aumento das transaminases. Estes efeitos são reversíveis e pouco pronunciados não se verificando, por outro lado, a ocorrência de alopecia, neurotoxicidade ou cardiotoxicidade [7,8].

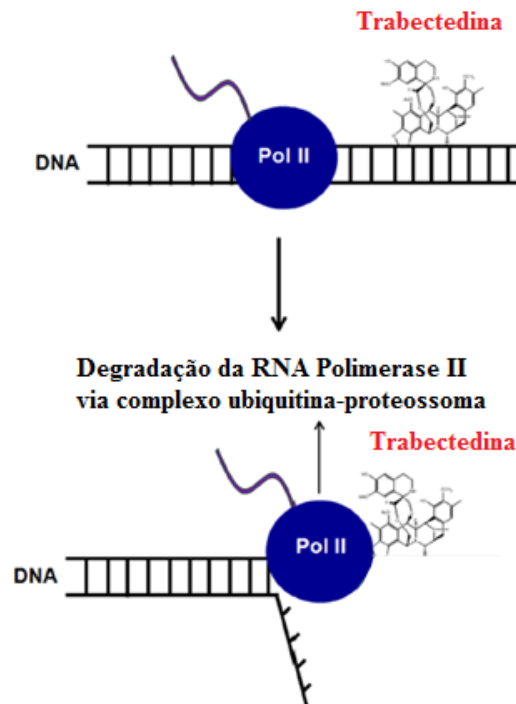
No presente, Yondelis<sup>®</sup> é considerado um medicamento órfão pela EMA e pela FDA. Consequentemente, em Portugal, o recurso a este fármaco carece de uma “Autorização de Utilização Excepcional” dirigida ao INFARMED, I.P., a partir do hospital do Sistema Nacional de Saúde que solicita o acesso ao mesmo [62,63].

### **5.3.1 Mecanismo de ação**

O potencial efeito antitumoral da trabectedina conta com cerca de 40 anos de investigação e é obtido através de diferentes mecanismos de ação, tais como a ligação do péptido ao sulco menor da dupla hélice de DNA, a interferência da trabectedina com mecanismos de reparação do DNA e do ciclo celular, a interação com fatores de transcrição, entre outros [64].

A trabectedina exibe um mecanismo de alquilação do DNA em muito diferente de outros agentes alquilantes. Deste modo, sabe-se que a trabectedina tem a capacidade de se ligar por meio de ligações covalentes reversíveis à dupla hélice do DNA, a partir dos grupos amina dos resíduos de guanina, no sulco menor da cadeia. Esta ligação origina uma destabilização no ácido nucleico, que conduz ao dobramento e sobreposição do sulco menor com o sulco maior [7,64]. Consequentemente, este dobramento reflete-se na posterior desorganização do citoesqueleto, no bloqueio do ciclo celular (na fase G1) e na interferência do reconhecimento e ligação normal a fatores de transcrição, causando a ativação ou inibição de determinados genes. Destacam-se, como exemplos, o gene *CAT* e o gene regulador da expressão da proteína metalotioneína, importantes na regulação celular do stress oxidativo [7].

A trabectedina possui, também, a capacidade de inibir a transcrição do DNA durante o processo de alongação, mediante a colisão do péptido com a RNA Polimerase II. Esta enzima, fundamental na expressão genética, ao ser bloqueada é impedida de completar o normal ciclo de adição de nucleótidos, originando um transcrito que é terminado prematuramente. A RNA Polimerase II é posteriormente degradada através do complexo de proteólise ubiquitina-proteassoma que, consequentemente, induz a quebra da cadeia de DNA em formação [60].



**Figura 5.3 – Interação da trabectedina com a RNA Polimerase II e posterior degradação desta enzima, com a consequente quebra da síntese de DNA.** Adaptado de Larsen *et al.* [60].

Contudo, sabe-se também que a degradação da RNA Polimerase II é dependente da presença do complexo TC-NER (*Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair*), uma via de reparação por excisão de nucleótidos acoplados à transcrição, que tem demonstrado exercer um papel fundamental na atividade clínica da trabectedina. Esta via permite a reparação de erros na síntese de DNA induzidos pela radiação UV e outros agentes carcinogêneos e, ainda, alguns agentes alquilantes e cisplatina. As células nas quais esta via de reparação aparenta não estar funcional demonstram ser resistentes ao tratamento com trabectedina, permitindo deduzir que esta é uma via essencial para a morte celular induzida por este péptido [7,60]. Atendendo ao facto de que várias das proteínas do complexo TC-NER desempenham um papel significativo na regulação da transcrição, é possível que a sensibilidade reduzida da trabectedina em células deficientes neste complexo de reparação esteja relacionada com a própria interferência do fármaco com a transcrição [65].

Por outro lado, a inibição da transcrição do gene *MDR1* constitui um dos efeitos fulcrais da trabectedina, sendo este gene responsável pela produção de glicoproteína-P. Esta proteína funciona como um transportador de efluxo, que medeia a passagem de

fármacos citotóxicos para o meio extracelular, podendo apresentar-se sobrepresa em células tumorais. Deste modo, a glicoproteína-P confere às células um mecanismo de resistência a múltiplos fármacos, capaz de ser prevenida através do recurso à trabectedina como coadjuvante na terapêutica antineoplásica [7,65].

Adicionalmente, estudos comprovam que as células que carecem de um mecanismo de recombinação homóloga competente, como os genes supressores de tumor BRAC-1 e BRAC-2, nos quais ocorreu uma mutação, apresentam-se cerca de 100 vezes mais sensíveis à trabectedina [66].

Estudos recentes sugerem a envolvimento da trabectedina no microambiente do tumor, na medida em que este representa um potencial alvo na terapêutica do cancro. Para além da atividade demonstrada a nível das células tumorais, a trabectedina induz a apoptose de células do sistema imunitário, nomeadamente monócitos e macrófagos, efeito que surge associado a uma redução da angiogénese. Além do efeito direto a nível destas linhagens celulares, a baixas concentrações, a trabectedina inibe a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios [60,64].

Em consequência dos diversos mecanismos de ação nos quais a trabectedina está envolvida, alguns investigadores consideram este péptido ideal no desenvolvimento de estratégias moleculares direcionadas para os respetivos alvos de atuação. Desta forma, é possível incluir combinações de fármacos contendo trabectedina, de modo a obter uma maior eficácia com uma menor dose de fármaco e, consequentemente, reduzir a toxicidade associada a este tipo de terapêuticas [60,64].

### **5.3.2 Trabectedina e ensaios clínicos**

O ano de 1996 dita o início dos ensaios clínicos de Fase I envolvendo a trabectedina pelo que, atualmente, este péptido encontra-se em ensaios que contemplam diferentes fases. Dentro destes, destaca-se um estudo retrospectivo com o objetivo de comprovar a eficácia do tratamento com trabectedina, em doentes com sarcoma dos tecidos moles. Trata-se de um ensaio clínico de Fase IV, com vista à retirada de conclusões acerca do uso do péptido em ambiente clínico [67, 68]. Em decurso, destaca-se também, um estudo relativo à eficácia da trabectedina em leiomiossarcoma retroperitoneal e lipossarcoma bem diferenciado/diferenciado, após falha de antraciclinas e ifosfamida, ou em pacientes resistentes a ambos os fármacos [69, 70]. Este estudo visa confirmar a atividade do péptido, em termos de desaceleração do crescimento tumoral e

pretende investigar o benefício que este tratamento pode oferecer, de modo a auxiliar na tomada de decisão clínica multidisciplinar no tratamento deste tipo de sarcomas [71-73]. Do mesmo modo, encontra-se a decorrer um estudo de Fase II sobre a atividade da trabectedina em pacientes com mesotelioma pleural maligno, cujo resultado favorável conduzirá ao alargamento da utilidade terapêutica do péptido [74,75].

Dos estudos que estão programados, mas ainda não iniciados, destacam-se um ensaio de Fase II com vista à avaliação da atividade da trabectedina, mediante a progressão do carcinossarcoma uterino, bem como o desenvolvimento de toxicidade do fármaco [76]. Em foco, está também um estudo de comparação entre a atividade deste péptido isoladamente, em detrimento do uso de doxorubicina e dacarbazina em terapêutica de combinação, no tumor fibroso solitário avançado [77,78].

Para além de ensaios em curso com vista a comprovar a eficácia da trabectedina em regime de monoterapia existem, igualmente, estudos para avaliar a combinação deste péptido juntamente com outros fármacos citotóxicos, e avaliação do respetivo efeito sinérgico. Exemplos disso são um estudo de Fase I, que avalia a segurança, tolerabilidade e farmacocinética de doses crescentes de olaparib e trabectedina em pacientes com sarcomas avançados/metastáticos não ressecáveis [79]. Estão também em estudo outras combinações contendo o péptido, no que toca ao tratamento de cancro uterino e do ovário, cancro da trompa de Falópio e peritoneal primário [80-83]. Por outro lado, os estudos que visam avaliar a qualidade de vida dos pacientes tratados com trabectedina comparativamente com os que recebem tratamento proveniente de outros fármacos citotóxicos estão em processo, cujo resultado favorável a nível do uso deste péptido permitirá aumentar a confiança inerente à trabectedina [84].

## **5.4 Dolastatinas**

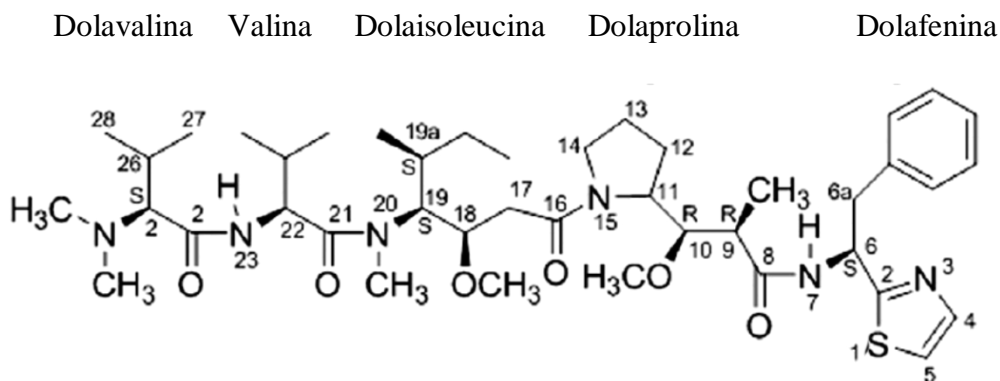
As dolastatinas são um grupo de compostos com ação citotóxica notável e foram isoladas no ano de 1972, a partir de *Dolabella auricularia* (Figura 5.4), um molusco existente no Oceano Índico, vulgarmente conhecido como “lebre marinha”. No entanto, descobertas recentes sugerem que este conjunto de péptidos é, atualmente, produzido por cianobactérias marinhas, consumidas pela espécie *Dolabella auricularia*, que possuem funções de defesa da espécie contra os predadores [1,85].



**Figura 5.4 – *Dolabella auricularia*.** Esta espécie representa um molusco marinho que pertence à família *Aplysiidae*, e é comumente designada “lebre marinha”. A coloração deste organismo pode variar entre tons de verde e castanho. Trata-se de uma espécie com dimensões elevadas, que pode atingir cerca de 40 cm de comprimento. O corpo do animal é frequentemente coberto por papilas, conferindo-lhe uma aparência espigosa. Adaptado de Maderna *et al.* [85].

Até à data, diversas dolastatinas com potencial efeito citotóxico foram isoladas, como a dolastatina 10 e a dolastatina 15, conferindo-se especial destaque à dolastatina 10, graças à sua ação em múltiplas linhas celulares de cancro. A dolastatina 10, cuja estrutura química se apresenta na Figura 5.5, é um depsipéptido linear constituído por cinco aminoácidos de estrutura relevante (dolavalina, valina, dolaisoleucina, dolaprolina e dolafenina) [1,86].

A dolastatina 10 iniciou os ensaios clínicos de Fase I do NCI no ano de 1990. Pouco tempo depois, progrediu para ensaios de Fase II, com vista à aplicação na terapia de neoplasias metastáticas do pâncreas, neoplasia avançada do rim, sarcoma avançado dos tecidos moles, como mama e pulmão, e carcinoma da próstata em doentes que não responderam perviamente à hormonoterapia. Estes ensaios incluíram, ainda, indicações terapêuticas para algumas leucemias, como a leucemia linfocítica crónica, e diversos linfomas [86].



**Figura 5.5 – Estrutura química da dolastatina 10 e respetivos aminoácidos que fazem parte da sua constituição.** Os números contidos na imagem traduzem a numeração dos carbonos que integram o péptido linear. A representação diz respeito ao enantiómero *S* da dolastatina 10. Adaptado de Gajula *et al.* [86].

No entanto, todos os estudos cessaram devido à ausência de resultados significativos, tendo-se verificado mielotoxicidade e neuropatia periférica como principais efeitos adversos associados à administração do composto. A falta de atividade inerente ao péptido pode, contudo, estar associada ao desenvolvimento de resistência no mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P [86]. Todavia, quer a dolastatina 10 como a dolastatina 15 contribuíram positivamente para o desenvolvimento de análogos, com o objetivo aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade, através de estudos de estrutura-atividade. Atualmente, conhecem-se vários derivados sintéticos das dolastatinas, como a cemadotina (LU-103793), a sintadotina (ILX-651) e a auristatina (soblidotina/TZT-1027), sendo este último péptido aquele que é alvo de um maior número de ensaios clínicos, de entre os restantes enumerados [60].

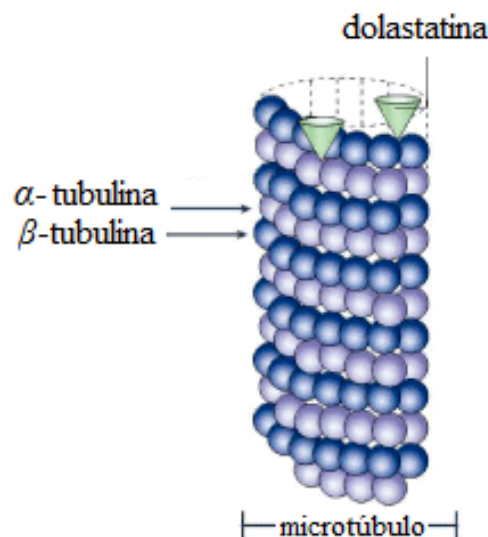
**Quadro 5.3 – Análogos sintéticos da dolastatina 15.** A cemadotina (LU-103793) evidenciou segurança nos ensaios clínicos de Fase I e melhorou a qualidade de vida de alguns pacientes com cancro do pulmão. No entanto, não demonstrou resultados efetivos em termos de citotoxicidade contra tumores. A sintadotina (ILX-651) apresentou boas respostas nos ensaios de Fase I, verificando-se a cura de um paciente com melanoma metastático e, noutros casos, a estabilização da doença. Além do melanoma, foram também tratados tumores sólidos, igualmente com bons resultados em Fase I. Relativamente à toxicidade, a sintadotina foi considerada segura e bem tolerada, sendo relatados efeitos secundários como alopecia, náuseas, vômitos e fadiga. Os ensaios de Fase II já se encontram terminados, porém, ainda não há resultados publicados. Adaptado de Larsen *et al.* [60].

Derivados sintéticos da dolastatina 15					
	Fase de estudo clínico				Indicação terapêutica
	Fase I	Fase II	Fase III		
<b>Cematodina</b> (LU-103793)					Melanoma, cancro da mama
					Tumores sólidos
	Fase de estudo clínico				Indicação terapêutica
	Fase I	Fase II	Fase III		
<b>Sintadotina</b> (ILX-651)					Melanoma, próstata

### 5.4.1 Mecanismo de ação

A dolastatina 10 é um agente antimitótico potente, que exerce o seu efeito a nível do bloqueio da divisão celular. Para tal, a dolastatina 10 atua através de um mecanismo de inibição não-competitiva, por ligação à subunidade  $\beta$  da tubulina, em sítios específicos para a ligação aos alcaloides da vinca. A tubulina, por sua vez, é uma proteína globular, que integra a composição dos microtúbulos. Constituída por dois tipos de cadeias polipeptídicas, designadas  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina, é a partir da cadeia  $\beta$  que ocorre a ligação à dolastatina, conforme representado na Figura 5.6 [1,62,86].

Os microtúbulos são um dos principais componentes do citoesqueleto eucariota e exercem um papel fundamental na mobilização celular de cílios e flagelos. Estes elementos desempenham funções a nível da organização celular e da separação dos cromossomas, durante a divisão celular. Consequentemente, a dolastatina 10 ao bloquear a ação da tubulina afeta não só a formação de microtúbulos, como a hidrólise de guanosina trifosfato (GTP) dependente de tubulina. Desta forma, a polimerização dos microtúbulos é inibida, o que bloqueia o seu alongamento e formação, impedindo a formação do fuso mitótico, crucial para que o processo de divisão celular seja completado [85,86].



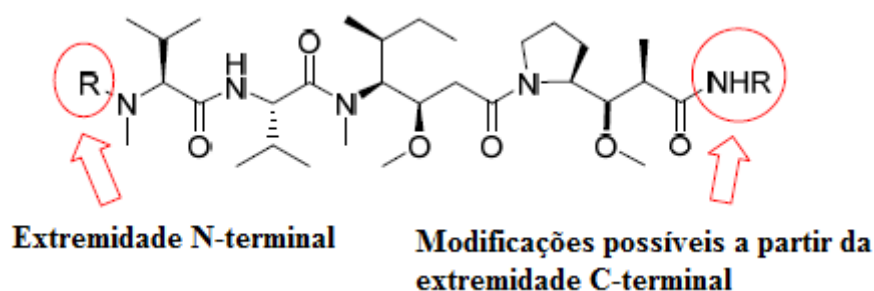
**Figura 5.6 – Mecanismo de ação da dolastatina 10.** Os microtúbulos são constituídos por duas cadeias polipeptídicas:  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina. A dolastatina atua por ligação à  $\beta$ -tubulina, originando uma cascata de eventos que culmina no bloqueio da divisão celular. Adaptado de Brandão *et al.* [87].

Adicionalmente, a dolastatina 10 demonstrou induzir a apoptose em diversas linhas de células tumorais, incluindo cancro da mama, cancro do pulmão, algumas leucemias e linfomas. Este efeito manifesta-se, por um lado, através da diminuição da expressão da Bcl-2, uma proteína oncogénica que inibe a apoptose e, por outro, mediante o aumento da expressão da p53, uma proteína envolvida na apoptose de células danificadas, cuja principal função é a manutenção da integridade da sequência nucleotídica do material genético [62].

## 5.5 Auristatinas

As auristatinas representam um grupo de análogos sintéticos obtidos a partir da dolastatina 10. A existência de uma amina secundária na extremidade N-terminal, confere-lhe uma maior predisposição ao ataque nucleófilo e, conseqüentemente, a possibilidade de se conjugar com anticorpos monoclonais. Esta descoberta conduziu ao desenvolvimento moléculas farmacologicamente ativas, tendo por base a associação deste péptido com um anticorpo monoclonal. Tendo em conta a elevada toxicidade da auristatina, a principal vantagem do desenvolvimento de conjugados fármaco-anticorpo prende-se com a diminuição da dose eficaz de fármaco, o que se traduz num acréscimo relativamente à segurança inerente ao composto. Não obstante, os anticorpos monoclonais manifestam propriedades funcionais importantes, na medida em que permitem a ligação altamente seletiva a epítomos específicos nos antígenos alvo. Esta característica torna-se particularmente útil na terapêutica oncológica, tendo em conta o objetivo *major* de diminuir a citotoxicidade nas células saudáveis [85,88].

Por outro lado, a extremidade C-terminal é passível de modificações químicas conduzindo, assim, a um vasto leque de possibilidades, no que toca à síntese de novos compostos [88].

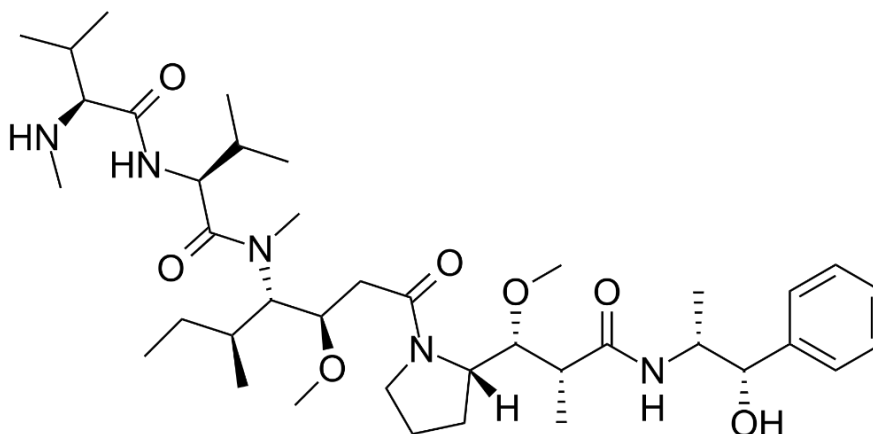


**Figura 5.7 – Locais propícios a modificações estruturais nos análogos sintéticos da auristatina.** Adaptado de Beesoo *et al.* [1].

A monometil-auristatina E (MMAE), também conhecida por TZT-1027 ou soblidotina, foi desenvolvida no sentido de manter a potente atividade antitumoral da dolastatina 10 reduzindo, simultaneamente, a toxicidade a esta associada [87].

Como está representado na Figura 5.8, a estrutura química da MMAE apenas difere do composto original na substituição do resíduo dolafenina, por um grupo anilina [89].

Tal como a dolastatina, a MMAE atua através da inibição da ação da tubulina e induz a apoptose das células tumorais. Estudos desenvolvidos em torno deste péptido, demonstraram eficácia quanto à inibição significativa da proliferação celular em leucemias P388. O péptido evidenciou, também, resultados favoráveis ao nível da diminuição de três linhagens celulares de tumores sólidos (melanoma B16, adenocarcinoma do cólon 26 e sarcoma do reticulo celular). Adicionalmente, MMAE demonstrou atividade em alguns tipos de carcinomas da mama e pulmão [1,89].



**Figura 5.8** – Estrutura química da monometil-auristatina E. Adaptado de Rawat *et al.* [89].

### **5.5.1 Brentuximab vendotina (Adcetris®)**

O brentuximab vendotina (Adcetris®, SGN-35) é um fármaco que consiste num anticorpo anti-CD30, conjugado por meio de um ligante clivável por protease com monometil-auristatina E. Adcetris® foi aprovado pela FDA em agosto de 2011 e, pela EMA, em outubro de 2012, para o tratamento de linfoma de Hodgkin recidivante ou refratário e no linfoma anaplásico de grandes células (LAGC) [33]. De notar que, no primeiro ensaio clínico levado a cabo com vista a comprovar as referidas indicações terapêuticas, os resultados demonstraram uma elevada percentagem de remissões dos respetivos linfomas. Atualmente, o fármaco encontra-se aprovado em 65 países, entre os quais se encontra Portugal e, tal como a trabectedina, é considerado um medicamento órfão [90].

Brentuximab vendotina foi, também, testado pré-clinicamente em combinação com adriamicina, vinblastina e dacarbazina (AVD), um esquema de quimioterapia utilizado como primeira linha na terapêutica do linfoma de Hodgkin. Esta associação demonstrou uma atividade antitumoral significativamente aumentada, quando comparada com as terapêuticas que incluíram AVD e brentuximab vendotina em monoterapia sugerindo, assim, um potencial efeito sinérgico entre os fármacos. Como principais efeitos adversos associados a esta terapia destacam-se a neuropatia periférica, neutropenia, náuseas, vômitos e cansaço [91].

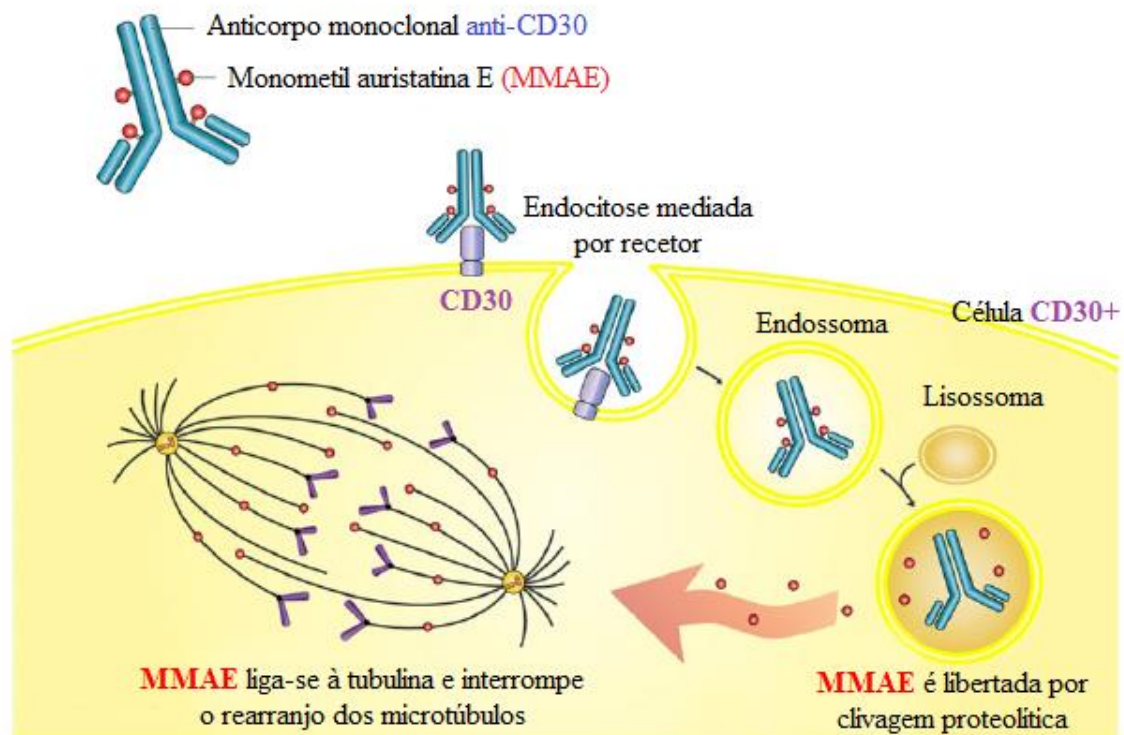
### **5.5.2 Mecanismo de ação**

Brentuximab vendotina é um conjugado anticorpo-fármaco que, ao libertar um agente citotóxico, induz a morte por apoptose de forma seletiva das células tumorais que expressam a proteína CD30 [91-93].

A CD30 é uma proteína transmembranar que pertence à família do recetor de necrose tumoral (TNF). O linfoma de Hodgkin e o LAGC sistémico expressam fortemente a proteína CD30, como um antígeno de superfície das suas células malignas, o que torna a terapêutica com brentuximab vendotina bastante seletiva para ambos os linfomas. Esta expressão é independente do estado da doença e da linha terapêutica, fazendo com que a proteína CD30 seja um ótimo alvo de intervenção. Dado que o mecanismo de ação é direcionado para a CD30, brentuximab vendotina é capaz de superar

a resistência associada à quimioterapia, uma vez que a proteína é altamente expressa em doentes refratários à quimioterapia combinada [92,93].

O processo a partir do qual o brentuximab exerce a sua atividade reúne múltiplas etapas. Inicialmente, a ligação do conjugado anticorpo-fármaco à CD30, na superfície celular, possibilita a posterior incorporação do complexo no meio intracelular. Seguidamente, ocorre a transição do complexo para dentro do espaço lisossomal e, uma vez dentro do lisossoma, MMAE é libertada por meio de uma clivagem proteolítica. A consequente ligação da MMAE à tubulina origina a desagregação da rede de microtúbulos no interior da célula, induz a paragem do ciclo celular e resulta na morte programada das células tumorais que expressam a proteína CD30 [92,93].



**Figura 5.9 – Mecanismo de ação do anticorpo monoclonal brentuximab conjugado com o péptido monometil-auristatina E (MMAE).** Uma vez dentro do lisossoma, MMAE é libertado por meio de uma clivagem proteolítica, o que permite a sua ligação à tubulina. Consequentemente, o rearranjo dos microtúbulos é interrompido, induzindo a paragem do ciclo celular e apoptose das células tumorais. Adaptado de Eyre *et al.* [92].

### **5.5.3 Brentuximab vendotina e ensaios clínicos**

Brentuximab vendotina entrou em ensaios clínicos no ano de 2002 no Japão, nos Estados Unidos da América e na Europa, através da empresa farmacêutica *Daiichi Pharmaceuticals* [92]. Atualmente, o composto encontra-se inserido em 77 estudos em curso, dos quais se destacam, pela sua superioridade numérica, os ensaios de Fase II. Deste modo, decorre um estudo com vista à comprovação da taxa de resposta global do fármaco e, um outro, para avaliar a sua eficácia e segurança, em regime de monoterapia, em doentes com linfomas CD30 positivos (CD30+), refratários ou recidivos [94-98]. Por outro lado, encontra-se a decorrer um ensaio a fim de testar a eficácia do fármaco em linfomas de células T maduras que expressam baixos níveis de CD30+ [99]. Adicionalmente, brentuximab vendotina está também em análise a fim de aferir acerca da sua eficácia e segurança no tratamento de mesotelioma [100]. Destaca-se, também, um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia do fármaco no tratamento de doentes com mastocitose sistémica avançada ou leucemia dos mastócitos [101,102].

Além disso, encontram-se em desenvolvimento estudos com vista a comprovar a eficácia e segurança de brentuximab vendotina em regime de combinação com outros fármacos. Dentro dos mais comuns, destacam-se ensaios de Fase I e de Fase II que sugerem a combinação com fármacos como bendamustina, imatinib, everolimus, nivolumab, rituximab, ceritinib, bevacizumab, ibrutinib, linalonamida, no tratamento das patologias oncológicas para as quais o tratamento com brentuximab vendotina é adequado [103].

Por último, é de salientar os estudos com vista a comprovar a eficácia de deste fármaco comparativamente com outros anticorpos monoclonais. Destacam-se então, compostos como crizotinib e pembrolizumab, juntamente com protocolos de quimioterapia de combinação que incluem ifosfamida, etopósido e doxorrubicina. O crizotinib e o metotrexato são capazes de impedir o crescimento das células cancerígenas, através do bloqueio de algumas enzimas necessárias ao crescimento celular, tais como a tirosina cinase. No entanto, até ao momento, não há registos conclusivos quanto à maior eficácia de brentuximab vendotina ou crizotinib [104,105]. Por outro lado, o pembrolizumab é um anticorpo monoclonal que se liga ao recetor de morte programada-1 (PD-1) e bloqueia sua interação com os ligandos PD-L1 e PD-L2. Por sua vez, PD-L1 e PD-L2 são expressos em células apresentadoras de antigénio e podem ser expressos por tumores e outras células no microambiente do tumor. O recetor PD-1 é um regulador

negativo da atividade dos linfócitos-T, e demonstrou estar envolvido no controlo da resposta imunitária a estas células. Desta forma, pembrolizumab potencia a resposta dos linfócitos-T, incluindo a resposta antitumoral, através do bloqueio da ligação do PD-1 ao PD-L1 e PD-L2. O objetivo principal do estudo em curso, que visa comparar os fármacos brentuximab vendotina e pembrolizumab, é comprovar que este último prolonga a sobrevivência livre de progressão e a sobrevida geral dos doentes com linfoma de Hodgkin, por oposição ao brentuximab vendotina [106,107].

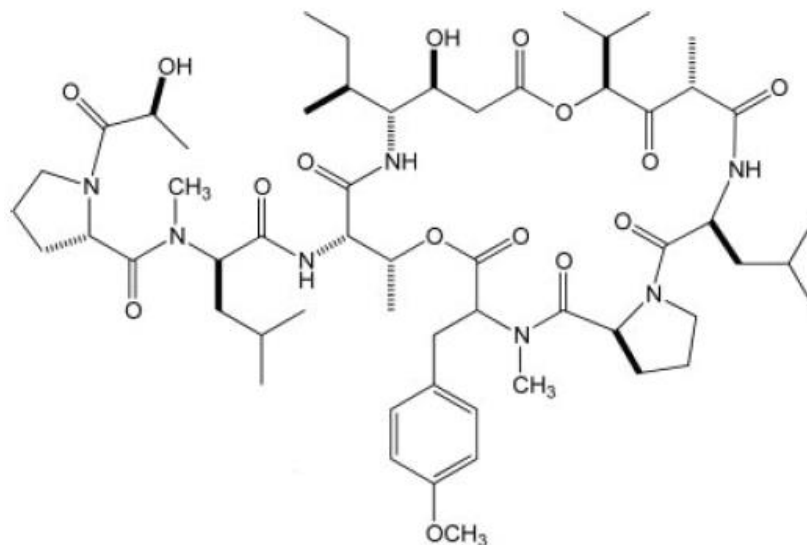
## 5.6 Didemnina B

A didemnina B é um depsipéptido cíclico isolado pela primeira vez em 1981, a partir da ascídia das Caraíbas *Trididemnun solidum* (Figura 5.10). Este péptido é considerado o primeiro PNM a ingressar em ensaios clínicos, com vista ao tratamento de doentes oncológicos [7].

Nos estudos *in vitro* e *in vivo*, a didemnina B demonstrou uma potente atividade antiviral, imunossupressora e anticancerígena. Os estudos pré-clínicos evidenciaram a inibição do crescimento de células em leucemias e melanomas. Este péptido foi, ainda, testado em ensaios clínicos de Fase I e II contra uma série de tumores, incluindo o cancro do ovário epitelial e da mama, carcinoma das células renais, cancro do pulmão de pequenas células e cancro da próstata [108].



**Figura 5.10 – *Trididemnun solidum*.** Trata-se de uma espécie que pertence à classe Ascidiacea (ascídiá), a mais diversa do subfilo dos tunicados. Os zooides formam uma túnica resistente que exibe tons cinza, mas pode adquirir a coloração azul, verde ou branca. O nome do péptido extraído desta espécie remete para a família à qual a mesma pertence (Didemnidae). Adaptado de Ankisetty *et al.* [108].



**Figura 5.11 – Estrutura química da didemnina B.** Adaptado de Varela *et al.* [4].

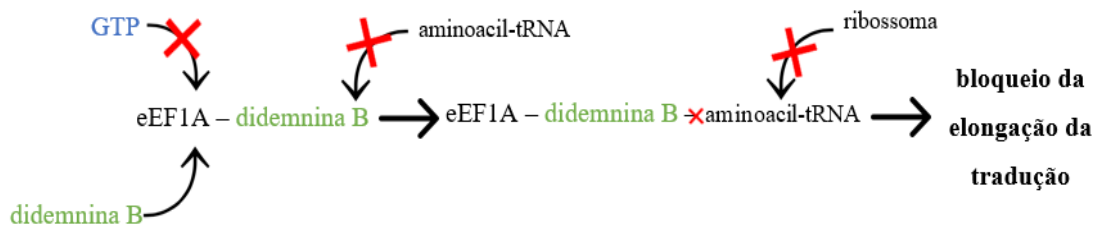
Todavia, o composto veio a revelar-se consideravelmente tóxico, provocando vários episódios de cardiotoxicidade e toxicidade neuromuscular. Por esta razão, os ensaios em torno deste péptido foram interrompidos em Fase II, em meados da década de 90. Alguns investigadores afirmam que o ajuste de doses e os esquemas de administração utilizados falharam na otimização de modo a favorecer a atividade antitumoral, ajustando-se de uma melhor forma à terapêutica imunomoduladora [7,41].

Contudo, experiência adquirida com os estudos realizados auxiliaram na conceção de análogos da didemnina B, com maior eficácia e menor incidência de efeitos adversos, como é o caso da plitidepsina (Aplidina<sup>®</sup>) [4].

### 5.6.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da didemnina B não se encontra completamente esclarecido. Os estudos mais recentes revelam que a didemnina B é um inibidor seletivo da elongação da tradução, mediado pelo fator de elongação da tradução eucariota, eEF1A (*eukaryotic translation elongation factor 1A*) [41,48].

Tal como mencionado no subcapítulo 4.1 Via Ribossomal, para ativar a elongação da tradução é necessário a ligação de GTP ao fator eEF1A. Posteriormente, o fator muda de conformação, tornando possível o recrutamento e transporte do primeiro tRNA carregado com o respetivo anticodão, do local A até ao local P do ribossoma. Esta etapa representa o início da elongação e é essencial para que a síntese proteica ocorra [49].



**Figura 5.12 – Diagrama esquemático que evidencia o papel da didemnina B no bloqueio da elongação da tradução.** A ligação da didemnina B ao fator de elongação da tradução eucariota eEF1 impede a junção do aminoacil-tRNA ao respetivo fator. Consequentemente, a ligação da subunidade ribossomal 40S ao aminoacil-tRNA é bloqueada, de modo que a elongação da tradução é forçosamente terminada. Adaptado de Marco *et al.* [49].

A didemnina B liga-se ao eEF1A, no sitio de ligação deste fator ao GTP. Consequentemente, o complexo didemnina B - eEF1A permanece no local A do ribossoma, impedindo a ligação de aminoacil-tRNA e a posterior elongação da tradução. Uma vez bloqueada a síntese proteica, o processo de divisão celular é inevitavelmente interrompido [109,110].

## 5.7 Plitidepsina

A plitidepsina (também conhecida como desidrodidemnina B ou Aplidina<sup>®</sup>) é o primeiro péptido marinho isolado do tunicado do mediterrâneo *Aplidium albicans*. Sugere-se, no entanto, que este péptido é sintetizado pelo simbiote de cianobactérias *Synechocystis trididemni*. Este composto, atualmente produzido por síntese química, é um depsipéptido cíclico que pertence à família Didemnidae, à semelhança do seu análogo didemnina B [4,41].

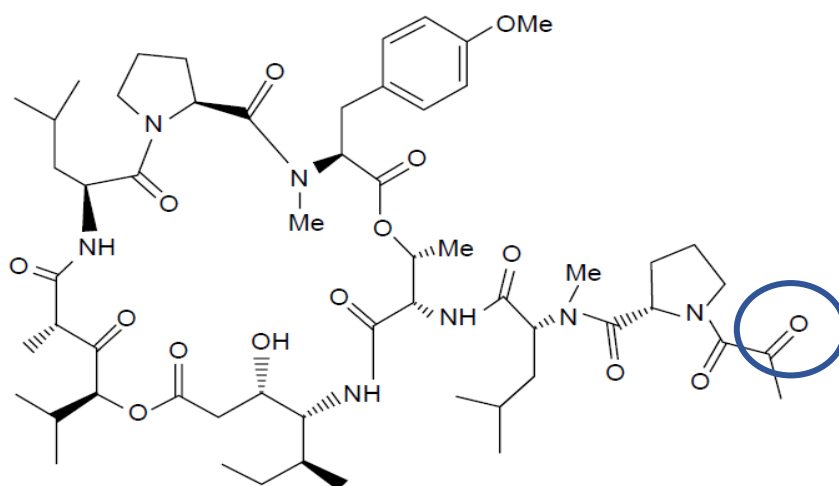


**Figura 5.13 – *Aplidium albicans*.** Representa uma ascídia que pertence ao subfilo dos tunicados. Esta espécie possui uma coloração que varia entre o branco e o amarelado. O organismo habita as águas do Mar Mediterrâneo e do norte do Oceano Atlântico, a mais de 50 metros de profundidade. Adaptado de Mayer *et al.* [36].

A estrutura molecular da plitidepsina (Figura 5.14) é composta por seis unidades macrocíclicas (leucina, prolina, treonina, N-metil-O-metil-tirosina, ácido 3-hidroxi-4-amino-5-metil-heptanoico e ácido 3-oxo-4-hidroxi-2,5-dimetilhexanoico) e cadeias terminais constituídas por três unidades moleculares (N-metil-leucina, treonina e piruvil-prolina) [4]. Este péptido possui um resíduo de lactil-prolina ao invés do resíduo de piruvil-prolina, existente na didemnina B, sendo esta a única diferença que consta na fórmula molecular de ambos os compostos [41].

A plitidepsina entrou em ensaios clínicos no ano de 1999 e foi licenciada para a empresa *PharmaMar*, em 2003, sob o registo de *Aplidina*<sup>®</sup>. Atualmente, é considerado um “medicamento órfão” pela FDA e pela EMA, para a terapia de mieloma múltiplo e leucemia linfocítica, embora a sua comercialização ainda não tenha sido aprovada por nenhuma destas autoridades [4,109].

Em estudos de estrutura e atividade citotóxica, a plitidepsina destacou-se como o péptido mais ativo num universo de 42 didemnininas, análogas naturais ou sintéticas, entre as quais se encontrava a didemnina B. *In vivo*, a plitidepsina evidenciou uma forte atividade na redução de diversos tumores, inclusive daqueles que se apresentavam resistentes à didemnina B mostrando, também, um perfil toxicológico mais favorável que o seu péptido análogo [7]. Simultaneamente, este péptido demonstrou melhores resultados *in vitro* do que a didemnina B em melanoma B16, leucemia P388, carcinoma de Ehrlich e tumores sólidos como cancro da mama, ovário, pulmão, colorretal e carcinoma gástrico. [41,109].

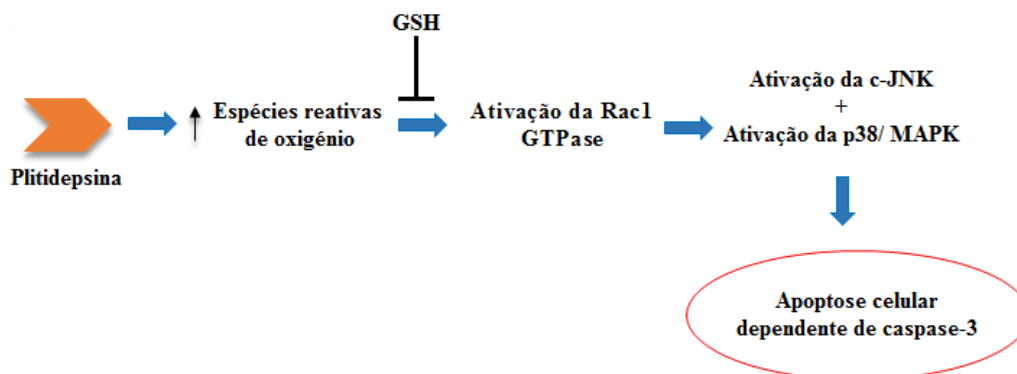


**Figura 5.14 – Estrutura química da plitidepsina.** Este péptido apenas difere da didemnina B por possuir um carbonilo (marcado por um círculo azul) em vez de um grupo hidroxilo num dos resíduos da componente linear do péptido. Adaptado de Alonso-Álvarez *et al.* [111].

Os efeitos adversos comumente reportados nos testes farmacocinéticos foram náuseas, fadiga, vômitos, anorexia e mialgia. Em termos hematológicos, destacam-se linfopenia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia. As alterações bioquímicas mais relatadas foram o aumento das transaminases (ALT e AST) e da creatina cinase. De um modo geral, o tratamento com este fármaco é bem tolerado e a toxicidade neuromuscular (como atrofia muscular e perda de filamentos de miosina espessa), principal efeito adverso limitante, pode ser contornada com a coadministração do aminoácido L-carnitina. De notar que as reações tipicamente relacionadas com a quimioterapia, como mucosite, alopecia e mielossupressão, são incomuns com este tipo de tratamento [41,110,111].

### 5.7.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da plitidepsina tem sido alvo de grande investigação nos últimos anos. Atualmente, sabe-se que se trata de um processo peculiar e que envolve várias vias relacionadas com a apoptose. São vários os estudos que comprovam que a plitidepsina atua por meio da estimulação da apoptose celular. Este fenómeno obtém-se se a partir da indução de stress oxidativo precoce, que potencia o aumento das espécies reativas de oxigénio e o consumo de glutathiona (GSH). Consequentemente, ocorre a rápida ativação da proteína Rac1 GTPase, e a ativação da cinase N-terminal c-Jun (c-JNK) e das proteínas cinases ativadas por mitogénio p38 (p38/ MAPK). A conjugação destes processos resulta, finalmente, na apoptose celular dependente de caspase-3, uma proteína fulcral na fase execução da morte celular. Este procedimento sequencial ocorre de forma muito rápida, na medida em que é possível observar a fosforilação de c-JNK cerca de 5 a 10 minutos após a exposição ao fármaco [109,111,112].



**Figura 5.15 – Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação da plitidepsina no âmbito da indução da apoptose celular.** O stress oxidativo causado pelo péptido provoca o consumo de GSH e ativação da Rac1 GTPase, da c-JNK e da p38/MAPK. Por sua vez, estes processos induzem a ativação da caspase-3, essencial para que se verifique a apoptose celular. Adaptado de Suárez *et al.* [112].

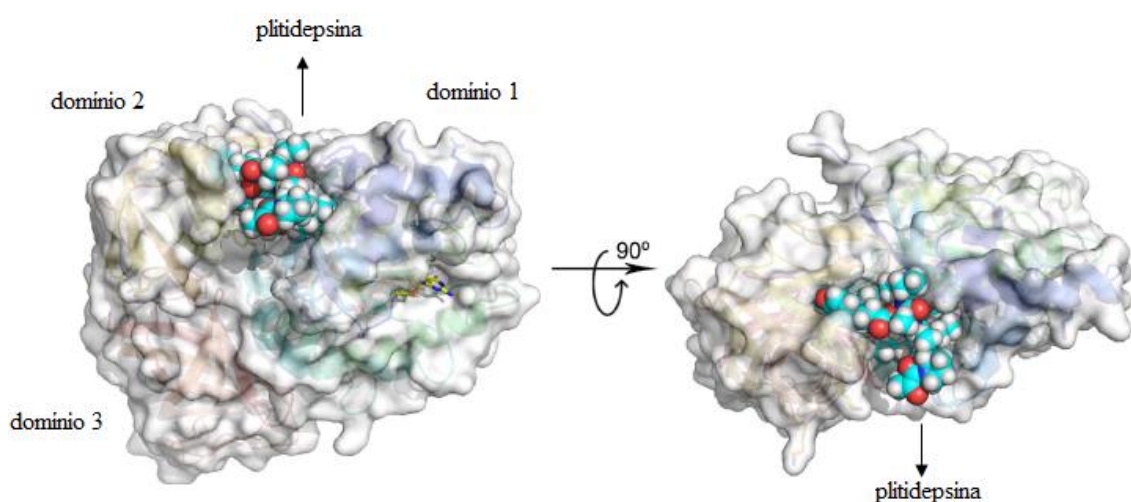
Além disso, a plitidepsina exerce igualmente a sua atividade no microambiente tumoral. Tal facto foi observado em modelos animais de ratinhos com leucemia linfocítica crónica (LLC). O péptido não afetou apenas o clone de células malignas de LLC, como também demonstrou uma potente atividade contra monócitos e células “*nurse*”, um subconjunto células que favorece a progressão de leucemias. Tal efeito é induzido pela ocorrência da apoptose, que é evidente a partir de um conjunto de fenómenos que comprovam esta morte celular programada. Como exemplos, destacam-se a exposição precoce de fosfatidilserina no folheto exterior da membrana plasmática, um composto fosfolipídico que habitualmente se encontra no interior da membrana plasmática e cuja passagem para o exterior significa que a célula se encontra em apoptose e, a ativação da caspase-3 [111,112].

Por outro lado, foi evidenciada atividade antiangiogénica para este fármaco, através do bloqueio da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da expressão do recetor VEGF-r1. O VEGF desempenha um papel crucial na angiogénese tumoral, uma vez que estimula a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. Por sua vez, este fator atua por meio da ligação a recetores específicos da tirosina cinase como VEGF-r1, VEGF-r2 e VEGF-r3. Dado que o aumento da expressão do VEGF e dos seus recetores está associado com a progressão e metastização tumoral, a inibição de ambos constitui uma via para o controlo da proliferação cancerígena [111-113].

Estudos recentes sugerem que o principal alvo molecular da plitidepsina é o fator de alongação eucariótico 1A2 (eEF1A2), que representa uma das isoformas do fator eEF1A, em eucariotas. Este fator encontra-se sobreexpresso em vários tipos de tumores, como mieloma múltiplo, cancro da próstata, do pâncreas, do ovário, entre outros. À semelhança do referido no mecanismo de ação da didemnina B (*vide* 5.6.1 Mecanismo de ação), a inibição do fator eEF1A2 permite o bloqueio da alongação da tradução e, consequentemente, o término da proliferação celular, devido à inibição da síntese de DNA e de proteínas [114]. A interação entre a plitidepsina e fator eEF1A2 é sugerida pelos seguintes resultados, obtidos experimentalmente a partir de amostras de músculo esquelético de coelho:

- a. a plitidepsina interage com o eEF1A2 com uma constante de dissociação (Kd) na gama nanomolar, compatível com as concentrações a partir das quais o fármaco evidencia o seu efeito indutor da apoptose celular;
- b. o fator eEF1A2 é a única proteína recuperada a partir de um lisado de células tumorais, através de um processo de fracionamento de ligação à plitidepsina;
- c. o fator eEF1A2 é, normalmente, gasto em células resistentes a plitidepsina, e a sua restituição a níveis normais permite a sensibilização das células ao composto.

Tendo em conta estes resultados, vários estudos concluem que o fator eEF1A2 é o alvo primário da plitidepsina, cuja interação com o fármaco medeia a própria atividade antitumoral [41,111,114].



**Figura 5.16 – Interação da plitidepsina com o fator eEF1A2, purificado a partir de amostras de músculo esquelético de coelho.** O modelo molecular proposto baseia-se na ligação da plitidepsina na interface dos domínios 1 e 2 do fator eEF1A2. Adaptado de Losada *et al.* [114].

### **5.7.2 Plitidepsina e ensaios clínicos**

A plitidepsina entrou em ensaios clínicos de Fase I em 1999, em países como Espanha, Canadá, Reino Unido, França e Estados Unidos da América. Atualmente, o péptido encontra-se em ensaios que contemplam as três fases [89,111].

Os ensaios de Fase I examinaram esquemas de tratamento com vista a analisar os efeitos da plitidepsina sobre tumores sólidos, concluindo-se que a dose recomendada para prosseguir com os ensaios de Fase II seria de 1,2 mg/ m<sup>2</sup>/ dia ou 3,2 mg/ m<sup>2</sup>/ semana, recorrendo à via endovenosa. Ainda em relação aos estudos de Fase I, foram realizados ensaios com vista à tirada de conclusões do efeito do fármaco em tumores malignos avançados, tais como cancro do cólon e linfoma não-Hodgkin. Este ensaio permitiu concluir que a dose recomendada para os ensaios clínicos de Fase II encontrar-se-ia entre 5 e 7 mg/m<sup>2</sup>, e que os testes deveriam contemplar o estudo da coadministração da L-carnitina, como forma de prevenção dos efeitos adversos nos tecidos musculares [41].

A plitidepsina progrediu para ensaios clínicos de Fase II no âmbito da aplicação na terapêutica do melanoma maligno avançado, do carcinoma da tiroide e das células renais e, ainda, do cancro do pulmão de pequenas células. No entanto, o péptido demonstrou uma atividade antitumoral limitada em todos os estudos efetuados [41]. Mais recentemente, dois estudos de Fase II vieram de novo aumentar o interesse neste fármaco. Um deles, com aplicação no mieloma múltiplo, permitiu concluir que a administração de plitidepsina em associação com dexametasona oral apresenta melhores resultados do que em regime de monoterapia. Por outro lado, um estudo em 67 pacientes com linfoma não-Hodgkin destacou-se pela taxa global de resposta obtida de 20,7%, incluindo duas respostas completas e quatro respostas parciais. Estes resultados permitiram sugerir que a plitidepsina possui atividade antitumoral em mieloma múltiplo e o linfoma não-Hodgkin, recidivante ou refratário [115].

A plitidepsina em associação com outros fármacos antineoplásicos está, atualmente, a ser avaliada. Destaca-se, assim, um estudo de Fase I que visa a retirada de conclusões acerca da coadministração deste péptido, juntamente com o anticorpo monoclonal bortezomib e dexametasona, em pacientes com mieloma múltiplo recidivo ou refratário. Este estudo tem como objetivos determinar a eficácia da combinação dos três fármacos, avaliar a tolerabilidade e segurança e, ainda, estudar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da respetiva associação [111,116].

Adicionalmente, em consequência dos resultados preliminares favoráveis no âmbito da conjugação de plitidepsina e dexametasona para o tratamento de mieloma múltiplo, está em curso um ensaio de Fase III, que visa clarificar a eficácia e a segurança deste esquema de quimioterapia [111,117].

## **Capítulo VI: Considerações finais**

### **6.1 Papel do farmacêutico**

De acordo com o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos, são várias as áreas laborais nas quais o farmacêutico pode desempenhar funções. Nesse sentido e, estabelecendo uma ponte entre a profissão farmacêutica e o tema subordinado à presente dissertação, as áreas que se destacam no âmbito do contributo do farmacêutico são a farmácia hospitalar, a farmácia comunitária, a indústria farmacêutica, os assuntos regulamentares e a investigação.

O farmacêutico hospitalar desempenha um papel crucial no âmbito do tratamento do doente oncológico baseado em quimioterapia. Primeiro, é o farmacêutico quem elabora e valida os protocolos prescritos pelo médico. Ao desempenhar esta função o farmacêutico deve reunir conhecimento suficiente acerca da patologia oncológica em questão, bem como relativamente ao conjunto de alternativas farmacológicas disponíveis. Além disso, o estado de saúde global do doente e alguns parâmetros bioquímicos e antropométricos devem ser avaliados previamente à administração de cada ciclo de quimioterapia, sendo o farmacêutico hospitalar um dos responsáveis por efetuar essa análise. Depois, ao integrar as equipas de decisão terapêutica, juntamente com vários médicos especialistas e enfermeiros, o farmacêutico deve, mais uma vez, dispor de conhecimento sólido e fundamentado acerca das opções terapêuticas disponíveis, de modo a intervir da melhor forma na aprovação dos tratamentos. Por outro lado, é essencial que o farmacêutico pratique uma farmacovigilância ativa, através da notificação de todas as suspeitas de reações adversas a medicamentos ao INFARMED, I.P., quer de fármacos citotóxicos como de outros medicamentos. O farmacêutico pode, ainda, participar nas equipas de investigação dos ensaios clínicos, dispondo do conhecimento necessário acerca do ensaio clínico em questão, de forma a estar apto para responder às eventuais questões que possam ser levantadas pelos participantes. Ainda neste âmbito, o farmacêutico responsável deve ser qualificado na área das boas práticas clínicas, de modo a garantir que sejam cumpridos os requisitos relacionados com o circuito dos medicamentos experimentais e dos dispositivos utilizados para a sua administração, bem como dos demais medicamentos já autorizados, necessários e complementares à realização dos ensaios clínicos.

Embora os fármacos citados na dissertação não sejam de dispensa em farmácia comunitária, o farmacêutico comunitário pode assumir um papel muito importante no acompanhamento do doente oncológico. Contudo, na verdade, o seu potencial não tem sido realmente aproveitado. Analisemos, então, o conjunto de possíveis situações que se segue:

- a. Na maior parte dos casos, o doente oncológico tem doenças crónicas concomitantes, pelo que frequenta a farmácia comunitária com a assiduidade que tais doenças obrigam. Considerando a situação ideal, em que o farmacêutico comunitário conhece o histórico de saúde do doente, desde logo deve despistar possíveis interações medicamentosas entre a terapêutica crónica e a terapêutica oncológica praticada no hospital. Adicionalmente, é frequente o doente encontrar-se debilitado do ponto de vista emocional e intelectual aquando de um processo oncológico, facto que facilita a desorientação na terapêutica crónica, seja pelo esquecimento, pela duplicação ou, muito comum, pela fraca adesão intencional, uma vez que o doente oncológico passa a encarar o cancro como o problema de saúde com maior importância. Neste último caso, é curioso observar que, com frequência, o doente ultrapassa o cancro (que se torna também uma doença crónica) e acaba por falecer ou sofrer algum evento por desleixo no tratamento das patologias crónicas. Neste contexto, o farmacêutico comunitário tem a obrigação de estar sensibilizado para estas questões e acompanhar o doente assegurando a adesão à terapêutica nas doenças crónicas;
- b. O doente oncológico sofre, com frequência, agudizações que se podem traduzir por cansaço, cefaleias ou outros sintomas comuns que, num indivíduo “não oncológico” poderiam ser alvo de aconselhamento na farmácia comunitária. Contudo, tal aconselhamento jamais deve ser aplicado ao doente oncológico. Nesse sentido, o farmacêutico comunitário deve saber que o doente se encontra em ciclo de quimioterapia ou entre ciclos e, face a qualquer destes sintomas, suspeitar de uma agudização e efetuar o encaminhamento médico imediato;
- c. O doente oncológico sofre também, com frequência, vários efeitos indesejáveis (como vómitos, náuseas, entre outros), os quais podem estar relacionados com o ciclo de quimioterapia em curso. Embora habitualmente se verifique o reporte destes efeitos ao enfermeiro, médico ou farmacêutico hospitalar, o farmacêutico comunitário deve, igualmente, conhecer a quimioterapia em causa e, no mínimo,

- face a qualquer queixa do doente, investigar a possibilidade de efeitos adversos, encaminhando até precocemente o doente ao médico;
- d. O doente oncológico é, tipicamente, um doente mais suscetível a infeções oportunistas (como por exemplo infeções respiratórias), devido ao comprometimento do seu sistema imunitário. Nesses casos, sintomas aparentemente simples como “tosse” ou “espirros” devem constituir motivos de encaminhamento ao médico, para que a situação possa ser avaliada e diagnosticada atempadamente e de forma adequada;
  - e. O doente oncológico beneficiaria imenso de uma estreita colaboração entre o farmacêutico hospitalar e o colega da farmácia comunitária. Se o farmacêutico comunitário efetuar o acompanhamento deste tipo de doentes pode enviar ao colega hospitalar ou até mesmo ao médico, por exemplo, alterações na terapêutica crónica. Considerando que, muitas vezes, os cuidados de saúde primários não comunicam os secundários, o farmacêutico comunitário pode ser, neste contexto, um elo de ligação muito importante, cruzando as terapêuticas do médico de família, com a de outros especialistas, e enviando aos profissionais de saúde do hospital.
  - f. Por último, mas não menos relevante, o farmacêutico comunitário pode exercer um papel muito importante na educação do doente oncológico para a compreensão/gestão da sua doença. Um doente informado é, certamente, um doente com maior probabilidade de sucesso terapêutico. Muitas vezes, no hospital, o doente está nervoso ou tem algum receio de perguntar ao médico sobre o porquê da sua doença, os cuidados que deve ter no dia-a-dia, a nível da alimentação e outros estilos de vida. Por isso, o farmacêutico comunitário deve dominar esta informação e transmiti-la ao doente de forma calma, organizada e estruturada.

No âmbito da indústria farmacêutica e dos assuntos regulamentares, é imperativo que o farmacêutico reúna o conhecimento necessário acerca das opções de quimioterapia disponíveis, de modo a intervir da melhor forma na decisão de introdução de fármacos no mercado nacional. Para isso, o farmacêutico deve conhecer as características dos fármacos e manter-se a par dos estudos publicados relativos aos ensaios clínicos, de forma a aferir acerca da eficácia, segurança, efeitos adversos do tratamento, entre outros. Tal conhecimento permitirá, também, ao farmacêutico participar na aprovação de utilização

do medicamento, quando a situação assim o permite. Deste último caso é exemplo a utilização dos péptidos trabectedina e brentuximab vendotina, uma vez que ambos são considerados medicamentos órfãos.

A área da investigação é crucial para que a aplicação clínica de péptidos marinhos com propriedades antitumorais possa sofrer uma expansão. Nesse sentido, o farmacêutico pode intervir na descoberta de potenciais novos péptidos e melhorar as suas características através de manipulação química, permitindo a obtenção de análogos sintéticos com melhor empregabilidade terapêutica, como o sucedido com o péptido auristatina.

## **6.2 Conclusão**

O cancro representa, irrefutavelmente, uma das patologias com maior taxa de mortalidade a nível mundial, cujo peso na sociedade se manifesta tanto a nível da carga da doença como relativamente aos cuidados a esta associados. Nesse sentido e, devido às características inerentes à patologia oncológica, é imperativo que a investigação científica determine o aparecimento de novas terapêuticas de modo a fazer face à doença.

Nas últimas três décadas assistiu-se a um aumento exponencial do conhecimento relativo aos péptidos marinhos, no âmbito das suas potencialidades e aplicações terapêuticas. Tal como mencionado ao longo da presente dissertação, a aplicação de péptidos marinhos na terapia oncológica reúne um vasto arsenal de vantagens, quando comparados com outros fármacos citotóxicos de origem terrestre. Destacam-se, assim, a maior seletividade para as células cancerígenas conseguida através de esquemas de quimioterapia tendo por base fármacos baseados em péptidos marinhos, a baixa relação dose/efeito e a probabilidade relativamente reduzida para o desenvolvimento de resistências medicamentosas. Adicionalmente, após uma análise cuidada em relação às características inerentes aos diferentes tipos de péptidos marinhos, torna-se possível classificar os péptidos cíclicos como melhor opção terapêutica comparativamente aos péptidos lineares. Uma das particularidades mais interessantes relaciona-se com a resistência que os péptidos cíclicos possuem à hidrólise por proteases endógenas e exógenas, fator que permite aumentar a atividade biológica do fármaco e, consequentemente, a sua eficácia.

Contudo, o isolamento de péptidos marinhos constitui um obstáculo ao desenvolvimento desta área científica. Em geral, para que seja possível a purificação de um determinado péptido marinho é necessária uma quantidade considerável de matéria-prima. Tal quantidade poderá aumentar quando os péptidos de interesse não são fáceis de purificar ou, por outro lado, caso estes se encontrem apenas em quantidades vestigiais nos organismos marinhos. Esta condição torna-se um obstáculo e, habitualmente, conduz à diminuição do interesse da indústria farmacêutica nesta área de investigação. Nesse sentido, a síntese química dos péptidos marinhos constitui uma ferramenta importante no auxílio da produção de grandes quantidades de péptidos, provocando um impacto ambiental mínimo sobre o ecossistema marinho.

Após a descoberta de péptidos cuja atividade promete ser promissora, os ensaios clínicos constituem um elemento fundamental para que se verifique o aumento da

aprovação de fármacos citotóxicos relacionados com péptidos marinhos. No entanto, os fatores financeiros e sociais, bem como o tempo associado a cada fase do ensaio constituem as principais limitações destes estudos. Mais uma vez, é imprescindível o interesse da indústria farmacêutica nesta área, na expectativa de que a aprovação de um novo medicamento poderá vir a ter na melhoria do estado de saúde do doente oncológico. Uma forma de induzir o interesse nesta área de investigação poderá ser o desenvolvimento de parcerias entre instituições académicas e industriais. Esta estratégia permitiria combinar o conhecimento científico da academia com a visão financeira associada à indústria farmacêutica, produzindo como resultados o aumento do número de publicações científicas e do financiamento para as instituições académicas, e o aparecimento de novos medicamentos comercializáveis por parte da indústria.

Um outro problema associado à falta de aprovação de fármacos citotóxicos baseados em péptidos marinhos prende-se com o âmbito da sua aplicação ter como base as doenças raras. Nesse sentido, os ensaios clínicos para medicamentos órfãos tornam-se difíceis de estabelecer por questões relacionadas com o pequeno número de doentes com determinado cancro raro; pelas questões logísticas envolvidas, uma vez que os doentes se encontram espalhados pelo mundo, o que torna o seu recrutamento muito dispendioso; pela heterogeneidade da doença oncológica e as diferenças associadas à sua severidade; pelo conhecimento limitado em relação à história natural da doença; bem como pelas questões éticas que são transversais a qualquer tipo de ensaio clínico.

O farmacêutico pode contribuir de forma importante no desenvolvimento e monitorização deste tipo de fármacos citotóxicos devendo, por isso, reunir um conhecimento científico sólido no que concerne às características da patologia oncológica e às várias opções terapêuticas já existentes no mercado.

Embora o número de fármacos aprovados tendo por base péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica seja ainda reduzido, são muitas as substâncias que se encontram em ensaios clínicos. Nesse sentido, efetuando alguns ajustes ao nível da estrutura química dos compostos poderá ser possível diminuir a sua toxicidade e/ou aumentar a sua seletividade. Esta e outras estratégias contribuirão para aumentar a potencialidade inerente aos péptidos que, associadas às evidências atuais, permitem deduzir um futuro otimista no que toca ao aumento da aprovação de péptidos marinhos com aplicação na terapia oncológica.

## Bibliografia

1. Beesoo R, Neergheen-Bhujun V, Bhagooli R, Bahorun T. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. *Mutation Research*. 2014;768:84–97.
2. Antoni S, Soerjomataram I, Møller B, Bray F, Ferlay J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. *Bulletin of the World Health Organization*. 2016;94(3):174–84.
3. National Cancer Institute. *Risk Factors for Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 6 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
4. Varela J, Vizetto-Duarte C, Custódio L, Barreira L, Albericio F. Marine Peptides and Proteins with Cytotoxic and Antitumoral Properties. In: Kim S-K, editor. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*. 1ª edição. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. 407-30 p.
5. Barnes TA, Amir E, Templeton AJ, Gomez-Garcia S, Navarro B, Seruga B, *et al*. Efficacy, Safety, Tolerability and Price of Newly Approved Drugs in Solid Tumors. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;56(1):1–7.
6. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Designs*. 2010;16(1):3–10.
7. Costa-Lotufo LV, Wilke DV, Jimenez PC, Epifanio RDA. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: historico & perspectivas. *Química Nova*. 2009;32(3):703–16.
8. Gordon EM, Sankhala KK, Chawla N, Chawla SP. Trabectedin for Soft Tissue Sarcoma: Current Status and Future Perspectives. *Advances in Therapy*. 2016;33(7):1055–71.
9. World Health Organization. *Health topics - Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 20 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en>
10. National Cancer Institute. *Dictionary of Cancer Terms* [Internet]. 2017. [acedido a 23 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
11. American Cancer Society. *Cancer basics* [Internet]. 2017. [acedido a 23 de janeiro de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
12. McAdam JA, Sharpe HA. Neoplasm. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J, editores. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8ª edição. Filadélfia: Saunders Elsevier; 2010. 282-353 p.

13. Tume-Farfán L. Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer. *Revista CENIC - Ciencias Biológicas*. 2014;45(3):200–9.
14. Hunt T, Nasmyth K, Novák B. The cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;366(1584):3494–97.
15. Liu G, Robins IH. A História Natural e a Biologia do Câncer. In: Doroshow J, Kwahait D, Nakao A, O’Sullivan B, editores. *Manual de Oncología Clínica da UICC*. 8ª edição. São Paulo: Wiley; 2006. 2-17 p.
16. Muller WJ, Lee YHPE. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(10):1–18.
17. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of New York Academy of Sciences*. 2015;1348(1):1–12.
18. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. United States of America: Garland Science; 2007.
19. Moasser MM. Neoplasias. In: Hammer GD, McPhee SJ, editores. *Fisiopatologia da Doença - Uma introdução à medicina clínica*. 7ª edição. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda.; 2016. 89-115 p.
20. Andonegui MA, Montalvo LA. Carcinogénese. In: Fraga JL, editor. *Manual de Oncología - Procedimientos Médico Quirúrgicos*. 4ª edição. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A.; 2010. 21-35 p.
21. National Cancer Institute. *Types of Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
22. American Cancer Society. *Leukemia* [Internet]. 2017. [acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia.html>
23. American Cancer Society. *Lymphoma* [Internet]. 2017. [acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/lymphoma.html>
24. American Cancer Society. *Multiple Myeloma* [Internet]. 2017. [acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma.html>
25. American Cancer Society. *Melanoma Skin Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 3 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer.html>
26. Pischon T, Nimpitsch K. Obesity and Risk of Cancer: An Introductory Overview. *Recent Results in Cancer Research*. 2016;208:1-15.
27. World Health Organization. *Media Center: Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 6 de julho de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

28. Miranda N, Portugal C, Nogueira PJ, Farinha CS, Oliveira AL, Alves MI, *et al.* Revista Científica da Direção-Geral da Saúde. In: Direção Geral da Saúde, editor. *Portugal – Doenças Oncológicas em Números – 2015*. 1ª edição. Lisboa, Portugal: Pinto Design e Comunicação; 2016.
29. American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures*. 3ª edição. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
30. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013;49(6):1347–403.
31. Kaliberov SA, Buchsbaum DJ. Cancer Treatment with Gene Therapy and Radiation Therapy. *Advances in Cancer Research*. 2012;215(1):221–63.
32. American Cancer Society. *How Chemotherapy Drugs Work* [Internet]. 2017. [acedido a 21 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>
33. National Cancer Institute. *Types of Cancer Treatment* [Internet]. [acedido a 21 de julho de 2017]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
34. De La Calle F. Fármacos de origen marino. *Les Biotechnologies*. 2007;58(1):141–55.
35. Cheung RC, Ng TB, Wong JH. Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine Drugs*. 2015; 13(7):4006-43.
36. Mayer AM, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, *et al.* The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010;31(6):255–65.
37. European Commission. *Blue Growth: Unlocking the potential of Seas and Oceans* [Internet]. 2017. [acedido a 13 de maio de 2017]. Disponível em: <https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/news/blue-growth-unlocking-potential-seas-and-oceans-0>
38. Roxin Á, Zheng G. Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Medicinal Chemistry*. 2012;4(12):1601–18.
39. Joo SH. Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. *Biomolecules and Therapeutics*. 2012;20(1):19–26.
40. Chai QY, Yang Z, Lin HW, Han BN. Alkynyl-containing peptides of marine origin: A review. *Marine Drugs*. 2016;14(11):1–18.
41. Kitagaki J, Shi G, Miyauchi S, Murakami S, Yang Y. Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. *Anticancer Drugs*. 2015;26(3):259–71.
42. Ozores HL, Granja JR. Péptidos cíclicos y su utilización en materiales poliméricos supramoleculares. *Anales de Química*. 2014;110(4):266–75.

43. Tapeinou A, Matsoukas MT, Simal C, Tselios T. Review cyclic peptides on a merry-go-round; towards drug design. *Biopolymers*. 2015;104(5):453–61.
44. White CJ, Yudin AK. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nature Chemistry*. 2011;3(7):509–24.
45. Kafri M, MetzI-Raz E, Jona G, Barkai N. The Cost of Protein Production. *Cell Reports*. 2016;14(1):22–31.
46. Weissman KJ. Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Natural Product Reports*. 2015;32(3):436–53.
47. Iwasaki S, Ingolia NT. The Growing Toolbox for Protein Synthesis Studies. *Trends in Biochemical Science*. 2017;42(8):412–24.
48. Mateyak MK, Kinzy TG. eEF1A: thinking outside the ribosome. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(28):21209–13.
49. Marco E, Martín-Santamaría S, Cuevas C, Gago F. Structural basis for the binding of didemnins to human elongation factor eEF1A and rationale for the potent antitumor activity of these marine natural products. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(18):4439–52.
50. Fixsen F, Lavett D/ Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM, editores. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7ª edição. Nova York: W. H. Freeman and Company; 2000.
51. Chan YA, Podevels AM, Kevany BM, Thomas MG. Biosynthesis of Polyketide Synthase Extender Units. *Natural Product Reports*. 2009;26(1): 90–114.
52. Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2009;48(26):4688–716.
53. INFARMED IP. *Ensaaios clínicos* [Internet]. 2016. [acedido a 14 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/ensaaios-clinicos>
54. Roche. *Fases dos ensaios clínicos* [Internet]. 2017. [acedido a 14 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.roche.pt/corporate/index.cfm/farmaceutica/ensaaios-clinicos-profissionais-de-saude/fases-dos-ensaaios-clinicos/>
55. Schwarzenberg KV, Vollmar AM. Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Letters*. 2013;332(2):295–303.
56. Marine Pharmacology. *Marine Pharmaceuticals: The Clinical Pipeline* [Internet]. 2016. [acedido a 26 de junho de 2017]. Disponível em: <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>

57. Schofield MM, Jain S, Porat D, Dick GJ, Sherman DH. Identification and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic natural product ET-743. *Environmental Microbiology*. 2015;17(10):3964–75.
58. Singh IP, Shah P. Tetrahydroisoquinolines in therapeutics: A patent review (2010-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2017; 27(1):17-36.
59. Manning T, Rhodes E, Loftis R, Phillips D, Demaria D, Newman D, *et al.* ET743: Chemical analysis of the sea squirt Ecteinascidia turbinata ecosystem. *Natural Product Research*. 2006;20(5):461–73.
60. Larsen AK, Galmarini CM, D’Incalci M. Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2016;77(4):663-71.
61. PharmaMar. *Soft Tissue Sarcoma and its Management* [Internet]. 2016. [acedido a 11 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.allthepowerofthesea.com/sarcoma/soft-tissue-sarcomas-and-their-management?page=4>
62. Zheng L, Lin X, Wu N, Liu M, Zheng Y, Sheng J, *et al.* Targeting cellular apoptotic pathway with peptides from marine organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2013;1836(1):42–8.
63. Orphanet. *Medicamentos órfãos* [Internet]. 2017. [acedido a 28 de agosto de 2017]. Disponível em: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=PT&Expert=82878](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=PT&Expert=82878)
64. Petek BJ, Loggers ET, Pollack SM, Jones RL. Trabectedin in soft tissue sarcomas. *Marine Drugs*. 2015;13(2):974–83.
65. De Sanctis R, Marrari A, Santoro A. Trabectedin for the treatment of soft tissue sarcomas. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016;17(11):1055-71.
66. D’Incalci M, Badri N, Galmarini CM, Allavena P. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *British Journal of Cancer*. 2014;111(4):646–50.
67. ClinicalTrials.gov. *Restrospective Study of Trabectedin in Soft Tissue Sarcomas (TrObs)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02793050?term=trabectedin&rank=1>
68. Angarita FA, Cannell AJ, Abdul RAR, Dickson BC, Blackstein ME. Trabectedin for inoperable or recurrent soft tissue sarcoma in adult patients: A retrospective cohort study. *BioMedicine Central Cancer*. 2016;16(30):1–11.
69. ClinicalTrials.gov. *Efficacy and Safety of Trabectedin (Yondelis®) in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcoma (YonSar)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=7>

70. Blay JY, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, Lorigan P, *et al.* Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: A European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) Soft Tissue and Bone Sarcoma Group trial. *Journal of Clinic Oncology*. 2005;23(3):576–84.
71. ClinicalTrials.gov. *Efficacy Study on Trabectedin in Retroperitoneal Leiomyosarcoma and Well Differentiated/Dedifferentiated Liposarcoma (TRAVELL)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02247544?term=trabectedin&rank=2>
72. Gronchi A, Bui BN, Bonvalot S, Pilotti S, Ferrari S, Hohenberger P, *et al.* Phase II clinical trial of neoadjuvant trabectedin in patients with advanced localized myxoid liposarcoma. *Annals of Oncology*. 2012;23(3):771–6.
73. De Sanctis R, Marrari A, Marchetti S, Mussi C, Balzarini L, Lutman FR, *et al.* Efficacy of trabectedin in advanced soft tissue sarcoma: beyond lipo- and leiomyosarcoma. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015; 9:5785-91.
74. ClinicalTrials.gov. *ATREUS - Phase II Study on the Activity of Trabectedin in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) (ATREUS)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02194231?term=trabectedin&rank=3>
75. Hoda MA, Pirker C, Dong Y, Schelch K, Heffeter P, Kryeziu K, *et al.* Trabectedin Is Active against Malignant Pleural Mesothelioma Cell and Xenograft Models and Synergizes with Chemotherapy and Bcl-2 Inhibition In Vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2016;15(10):2357–69.
76. ClinicalTrials.gov. *Trial On Trabectedin In The Treatment Of Advanced Uterine And Ovarian Carcinosarcoma (CS)\_MITO 26 (MITO 26)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=9>
77. ClinicalTrials.gov. *Study With Trabectedin Versus Adriamycin Plus Dacarbazine, in Patients With Advanced Solitary Fibrous Tumor (STRADA)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=40>
78. Martin-Broto J, Pousa AL, De Las Peñas R, Del Muro G, Gutierrez A, Martinez-Trufero J, *et al.* Randomized phase II study of trabectedin and doxorubicin compared with doxorubicin alone as first-line treatment in patients with advanced soft tissue sarcomas: A Spanish group for research on sarcoma study. *Journal of Clinic Oncology*. 2016;34(19):2294–302.
79. ClinicalTrials.gov. *Trabectedin Plus Olaparib in Metastatic or Advanced Sarcomas (TOMAS) (TOMAS)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=10>

80. ClinicalTrials.gov. *Bevacizumab and Trabectedin +/- Carboplatin in Advanced Ovarian Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=17>
81. ClinicalTrials.gov. *A Study Comparing the Combination of Trabectedin (Yondelis) and Doxil/Caelyx with Doxil/Caelyx for the Treatment of Advanced-Relapsed Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=51>
82. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, *et al.* Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin (PLD) versus PLD in recurrent ovarian cancer: Overall survival analysis. *European Journal of Cancer*. 2012;48(15):2361–8.
83. Krasner CN, Poveda A, Herzog TJ, Vermorken JB, Kaye SB, Nieto A, *et al.* Patient-reported outcomes in relapsed ovarian cancer: Results from a randomized Phase III study of trabectedin with pegylated liposomal doxorubicin (PLD) versus PLD Alone. *Gynecologic Oncology*. 2012;127(1):161–7.
84. ClinicalTrials.gov. *Patient Directed Intervention to Improve the Quality of Life for Patients With Soft Tissue Sarcoma (YonLife)* [Internet]. 2017. [acedido a 15 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367924?term=trabectedin&rank=65>
85. Maderna A, Doroski M, Subramanyam C, Porte A, Leverett CA, Vetelino BC, *et al.* Discovery of cytotoxic dolastatin 10 analogues with N-terminal modifications. *Journal of Medicine Chemistry*. 2014;57(24):10527–43.
86. Gajula PK, Asthana J, Panda D, Chakraborty TK. A synthetic dolastatin 10 analogue suppresses microtubule dynamics, inhibits cell proliferation, and induces apoptotic cell death. *Journal of Medicine Chemistry*. 2013;56(6):2235–45.
87. Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*. 2010;33(6):1359–69.
88. Beedessee G, Ramanjooloo A, Marie DEP. Marine natural products research in Mauritius: Progress and challenges. *Marine Chemistry*. 2015;170(1):23–8.
89. Rawat DS, Joshi MC, Joshi P, Atheaya H. Marine peptides and related compounds in clinical trial. *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*. 2006;6(1):33–40.
90. Pettit GR, Melody N, Chapuis JC. Antineoplastic Agents. 603. Quinstatins: Exceptional Cancer Cell Growth Inhibitors. *Journal of Natural Products*. 2017; 80(3):692-8.
91. Younes A, Connors JM, Park SI, Fanale M, O’Meara MM, Hunder NN, *et al.* Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly

- diagnosed Hodgkin's lymphoma: A phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):1348–56.
92. Eyre TA, Khan D, Hall GW, Collins GP. Anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma: Current and future perspectives in adult and paediatric disease. *European Journal of Haematology*. 2014;93(6):455–68.
93. European Medicines Agency. *Resumo das características do medicamento – Adcetris* [Internet]. 2012. [accedido a 30 de março de 2017]. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_\\_Product\\_Information/human/002455/WC500135055.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR__Product_Information/human/002455/WC500135055.pdf)
94. ClinicalTrials.gov. *Brentuximab Vedotin in Patients With Relapsed or Refractory EBV-and CD30-positive Lymphomas (Bretuximab)* [Internet]. 2017. [accedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02388490?term=MMAE&rank=1>
95. ClinicalTrials.gov. *Study on the Role of Brentuximab Vedotin as Single Agent in the Treatment of Relapsed/Refractory CD30+ PTCL Patients* [Internet]. 2017. [accedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02388490?term=MMAE&rank=22>
96. Gerber HP, Senter PD, Grewal IS. Antibody drug-conjugates targeting the tumor vasculature: Current and future developments. *MAbs*. 2009;1(3):247–53.
97. Horwitz SM, Advani RH, Bartlett NL, Jacobsen ED, Sharman JP, O'Connor OA, et al. Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood*. 2014;123(20):3095-100.
98. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125(9):1394-402.
99. ClinicalTrials.gov. *A Phase II Study of Single Agent Brentuximab Vedotin in Relapsed/Refractory CD30 Low (<10%). Mature T Cell Lymphoma (TCL)* [Internet]. 2017. [accedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02588651?term=MMAE&rank=10>
100. ClinicalTrials.gov. *Trial of Adcetris in CD30+ Malignant Mesothelioma* [Internet]. 2017. [accedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02588651?term=MMAE&rank=16>
101. ClinicalTrials.gov. *Brentuximab Vedotin in Treating Patients With Advanced Systemic Mastocytosis or Mast Cell Leukemia* [Internet]. 2017. [accedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02588651?term=MMAE&rank=18>

102. ClinicalTrials.gov. *Dose Ranging Study of Brentuximab Vedotin in Adults With Lupus* [Internet]. 2017. [acedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02588651?term=MMAE&rank=23>
103. ClinicalTrials.gov. *Search for studies: MMAE* [Internet]. 2017. [acedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MMAE&recr=Open&pg=3>
104. ClinicalTrials.gov. *Brentuximab Vedotin or Crizotinib and Combination Chemotherapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Stage II-IV Anaplastic Large Cell Lymphoma* [Internet]. 2017. [acedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01979536?term=MMAE&recr=Open&rank=51>
105. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian Journal of Cancer*. 2013;2(2):91–7.
106. ClinicalTrials.gov. *Study of Pembrolizumab (MK-3475) vs. Brentuximab Vedotin in Participants With Relapsed or Refractory Classical Hodgkin Lymphoma (MK-3475-204/KEYNOTE-204)* [Internet]. 2017. [acedido a 1 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02684292?term=MMAE%C2%B4&recr=Open&rank=33>
107. European Medicines Agency. *Resumo das características do medicamento – Keytruda* [Internet]. 2017. [acedido a de março de 2017]. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_\\_All\\_Authorised\\_presentations/human/003820/WC500190991.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR__All_Authorised_presentations/human/003820/WC500190991.pdf)
108. Ankisetty S, Khan SI, Avula B, Gochfeld D, Khan IA, Slattery M. Chlorinated didemnins from the tunicate *Trididemnum solidum*. *Marine Drugs*. 2013;11(11):4478–86.
109. Lee J, Currano JN, Carroll PJ, Joullié MM. Didemnins, tamandarins and related natural products. *Natural Product Reports*. 2012;29(3):404–24.
110. Potts MB, McMillan E, Rosales TI, Kim HS, Ou YH, Toombs JE, *et al.* Mode of action and pharmacogenomic biomarkers for exceptional responders to didemnin B. *Natural Chemical Biology*. 2015;11(6):401–8.
111. Alonso-Álvarez S, Pardal E, Sánchez-Nieto D, Navarro M, Caballero MD, Mateos MV, *et al.* Plitidepsin: design, development, and potential place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11(1):253–64.
112. Suárez Y, González-Santiago L, Zarich N, Dávalos A, Aranda JF, Alonso MA, *et al.* Plitidepsin Cellular Binding and Rac1 / JNK Pathway Activation Depend on Membrane Cholesterol Content. *Molecular Pharmacology*. 2006;70(5):1654–63.

113. Capp C, Zennig N, Wajner S, Maia AL. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. *Clinical & Biomedical Research - Revista HCPA*. 2009;29(1):51–9.
114. Losada A, Muñoz-Alonso MJ, García C, Sánchez-Murcia PA, Martínez-Leal JF, Domínguez JM, *et al.* Translation Elongation Factor eEF1A2 is a Novel Anticancer Target for the Marine Natural Product Plitidepsin. *Scientific Reports*. 2016;6(35100):1–15.
115. Ribrag V, Caballero D, Fermé C, Zucca E, Arranz R, Briones J, *et al.* Multicenter phase II study of plitidepsin in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(3):357–63.
116. ClinicalTrials.gov. *Study of Plitidepsin (Aplidin®) in Combination With Bortezomib and Dexamethasone in Patients With Multiple Myeloma* [Internet]. 2017. [accedido a 30 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02100657?term=plitidepsin&rank=5>
117. ClinicalTrials.gov. *Aplidin - Dexamethasone in Relapsed/Refractory Myeloma (ADMYRE)* [Internet]. 2017. [accedido a 30 de abril de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02100657?term=plitidepsin&rank=7>