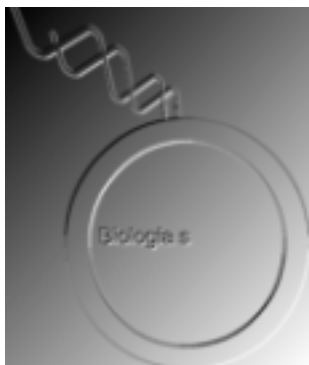


Apoptose:

Uma Questão de Vida ou de Morte



S. Solá, T. Pedro, H. Ferreira, C. M. P. Rodrigues

Centro de Patogénese Molecular
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Av. das Forças Armadas
1600-083 Lisboa

Editado por Rui Gomes e Cristina Bastos

Conceitos gerais

- A apoptose ou morte celular programada é um acontecimento comum, tanto em situações patológicas, contribuindo para fenómenos de inflamação e de disfunção orgânica, como em situações fisiológicas, no decurso de processos de embriogénese e metamorfose.
- As caspases são proteases que desempenham um papel central na apoptose e, consequentemente, constituem alvos farmacologicamente atractivos para a inibição e/ou potenciação da apoptose.
- A activação das caspases durante a apoptose ocorre por um de dois mecanismos: *i*) activação de receptores de morte celular; *ii*) perturbação mitocondrial.
- A inibição da apoptose poderá ajudar a combater doenças inflamatórias, do tipo agudo ou crónico, enquanto que a indução da apoptose em células T auto-reactivas, poderá proteger de doenças auto-imunes. Por fim, a indução selectiva da apoptose em células malignas constituirá uma estratégia excelente para o tratamento de doenças cancerígenas.

A única certeza da vida é a morte! De facto, os mecanismos fisiológicos de morte celular são essenciais como estratégia defensiva para remover células mutadas ou infectadas, como reposta a fenómenos de citotoxicidade ou, ainda, para um desenvolvimento embrionário normal. Nesta batalha entre a vida e a morte, a remoção de células indesejáveis nos organismos multicelulares ocorre por um de dois processos – a necrose ou a apoptose – ou, mesmo por ambos. Se no passado os especialistas acreditavam que estes processos ocorriam independentemente um do outro, são agora reconhecidos como co-existindo em muitas situações de saúde ou de doença, sendo por vezes difícil dissociá-los. Esta dificuldade emergiu não só porque existem algumas características comuns aos dois tipos de morte celular, mas também porque é frequente a ocorrência de necrose e apoptose, em simultâneo, na mesma célula. Torna-se, por isso, muitas vezes ambíguo e problemático distinguir com exactidão estes dois processos, apesar da existência de algumas características morfológicas e bioquímicas diferenciadoras (Tabela 1).

Tabela 1 – Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que distinguem a necrose da apoptose

Características	NECROSE	APOPTOSE
Morfológicas	• Perda da integridade membranar • Lise total da célula • Não há formação de vesículas • Desintegração dos organitos celulares	• Não há perda da integridade membranar • Agregação e marginalização da cromatina • Diminuição do volume citoplasmático e condensação do núcleo • Fragmentação da célula em corpos apoptóticos • Aumento da permeabilidade mitocondrial
Bioquímicas	• Perda da regulação da homeostasia iónica • Não requer energia • Digestão aleatória do DNA	• Processo altamente regulado, envolvendo activação enzimática • Dependente de ATP • Digestão não aleatória do DNA • Libertação de vários factores mitocondriais • Activação da cascata de caspases • Alterações na assimetria da membrana plasmática
Fisiológicas	• Afecta grupos de células • Iniciada por estímulos não fisiológicos • Fagocitose por macrófagos • Resposta inflamatória	• Afecta células individuais • Induzida por estímulos fisiológicos • Fagocitose por células adjacentes ou por macrófagos • Sem resposta inflamatória

Necrose ou apoptose: quando e porquê?

De um modo geral, a necrose ocorre quando existe um colapso da homeostasia celular, isto é, sempre que a célula sofre variações extremas das suas condições fisiológicas, como a hipotermia ou a hipóxia, sendo acompanhada por lise da membrana celular e subsequente libertação de componentes intracelulares para o exterior. Como consequência deste processo catastrófico, a

necrose provoca quase sempre inflamação. Pelo contrário, a apoptose é um processo de morte celular activo, mas silencioso, que ocorre em condições fisiológicas, de resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos e em que a célula participa na sua própria destruição. Normalmente, como não há perda da integridade membranar, a apoptose não é acompanhada de reacções inflamatórias drásticas.

A apoptose é, assim, a forma mais generalizada de morte celular, com especial relevância para o período de desenvolvimento embrionário, onde participa activamente nos processos de organogénese e de involução. Está, também, envolvida em processos de metamorfose relacionados com metaplasias, em quadros de alteração hormonal, como na menopausa, envolvendo células endometriais, nos tumores em fase de regressão ou de intensa proliferação e em muitas doenças virais. Por exemplo, quando ocorrem lesões no DNA, que podem não só interromper o desenvolvimento embrionário como ainda induzir a transformação de células normais, os níveis de expressão da proteína p53, indutora de apoptose e, por isso, anti-tumoral, são imediatamente aumentados, desencadeando a eliminação das células lesadas. No entanto, e apesar do seu importante papel, a apoptose em níveis elevados pode ser também responsável pelo aparecimento de inúmeras situações patológicas, como a colestase, as doenças neurodegenerativas, o enfarte de miocárdio e o envelhecimento precoce, entre outras. Pelo contrário, a apoptose é muito reduzida em doenças auto-imunes e no cancro. Este tipo de morte celular exige, por isso, um processo de regulação muito fino, onde o destino de viabilidade ou de morte é determinado pelo balanço entre as proteínas anti e pro-apoptóticas. A percentagem de erro na regulação da apoptose deverá ser, então, igual a zero, para que a célula não siga o caminho indesejado.

Como decorre o processo apoptótico?

A apoptose, por vezes também designada de morte celular programada, caracteriza-se pela ocorrência de várias alterações morfológicas nas células afectadas, nomeadamente ao nível da simetria dos folhetos fosfolipídicos da membrana, condensação e agregação da cromatina e fragmentação nuclear, terminando com a formação de corpos apoptóticos. Estas alterações morfológicas são o reflexo de uma sucessão de acontecimentos bioquímicos que culminaram na activação de uma família de proteases de cisteína, conhecidas como caspases, as quais possuem especificidade para resíduos de ácido aspártico. As caspases, uma vez activadas, clivam uma variedade de proteínas e substratos importantes para a viabilidade celular, numa função considerada de “execução”, sendo as proteases envolvidas designadas de “caspases executoras”.

As caspases residem na célula sob pro-formas inactivas, sendo, na maioria dos casos, activadas por clivagem proteolítica. Esta activação consiste na remoção do pro-domínio amino-terminal e na clivagem do polipéptido restante, resultando numa subunidade grande e numa subunidade pequena, que constituirão a enzima funcional. A via maioritária de activação das “caspases executoras” processa-se segundo a acção de outras proteases, designadas de “caspases iniciadoras”, requerendo estas a ajuda de proteínas adaptadoras, as quais se ligam aos motivos de interacção proteica localizados ao nível dos pro-domínios. A ligação do adaptador promove, assim, a activação das “caspases iniciadoras” que, de seguida, podem clivar e activar as “caspases executoras”. As moléculas adaptadoras estabelecem, deste modo, a ponte entre os eventos de sinalização e a activação das caspases, definindo duas vias gerais para a apoptose – a via mitocondrial e a via dos receptores de morte (ver Figura 1 e Caixa).

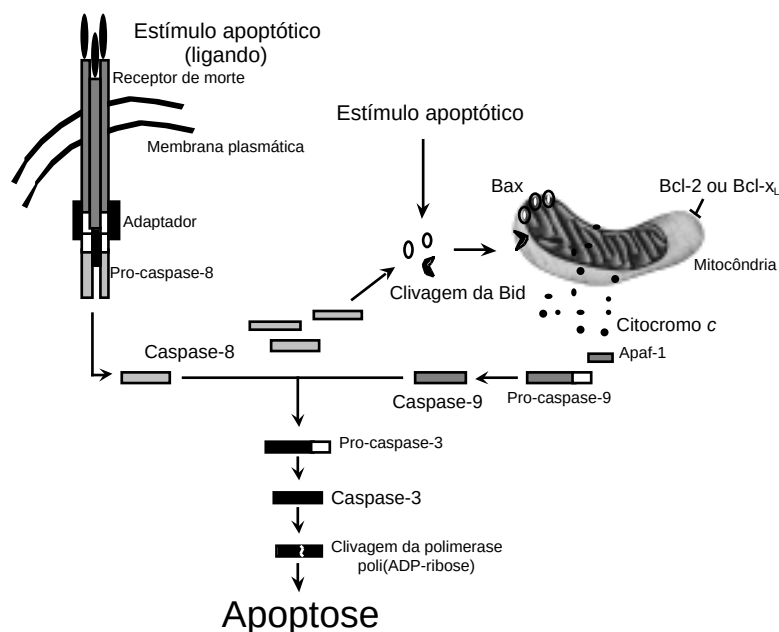


Figura 1 – Apoptose mediada pela via mitocondrial, pela via dos receptores de morte ou, ainda, pela convergência de ambas.

Exemplos de doenças que resultam de elevados níveis de apoptose

Doenças Hepáticas

Numa grande variedade de doenças hepáticas, como os carcinomas ou as doenças virais e imunológicas, foram observadas alterações morfológicas e bioquímicas características de um

processo de morte celular por apoptose. Parece, também, claro que a acumulação de ácidos biliares hidrófobos no interior do hepatocito poderá desempenhar um papel central nas lesões hepáticas durante a colestase, a qual ocorre em muitas doenças hepáticas crónicas incluindo a cirrose biliar primária, a obstrução maligna e iatrogénica dos ductos biliares e a atresia biliar.

A toxicidade induzida pelos ácidos biliares hidrófobos foi durante muito tempo caracterizada pelo aumento de volume do hepatocito, destruição da membrana plasmática e libertação dos constituintes celulares, tendo tal poder citotóxico sido atribuído à capacidade detergente daqueles compostos. Hoje, acredita-se que os ácidos biliares hidrófobos, essenciais para a absorção intestinal de gorduras, são também capazes de induzir a morte celular por apoptose no tecido hepático *in vivo*, bem como em culturas primárias de hepatocitos de rato e em linhas celulares de hepatoma humano.

A indução da apoptose pelos ácidos biliares hidrófobos parece envolver a libertação de citocromo *c*, como resultado de *stress* oxidativo, o qual por sua vez aumenta a actividade de caspases específicas, resultando na fragmentação de DNA. Esta activação das caspases pode, ainda, estar associada à indução da protease cisteína cathepsina B, que tem um papel importante como enzima efectora durante a apoptose. Foi também recentemente descrita uma via dependente da activação do Fas, onde os ácidos biliares hidrófobos parecem actuar como indutores importantes. Contrariamente à acção tóxica dos ácidos biliares hidrófobos, o ácido ursodeosoxicólico é um forte inibidor da apoptose, por prevenir a libertação mitocondrial de citocromo *c*, inibindo a subsequente activação das caspases e a clivagem da polimerase poli-(ADP-ribose).

A família de proteínas Bcl-2 também é expressa no fígado. A este nível, a Bcl-2 é capaz de inibir a apoptose por prevenir a oxidação dos constituintes celulares como o DNA, para além de impedir a maturação e libertação de corpos apoptóticos suprimindo a activação das caspases. Por outro lado, a proteína Bax pode ligar-se ao megaporo de transição da permeabilidade mitocondrial, juntamente com o translocador do nucleótido adenina, aumentando a permeabilidade da membrana da mitocôndria e desencadeando a morte celular.

Doenças Neurodegenerativas

A morte prematura de células neuronais tem sido muitas vezes associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington. No cérebro de um doente de Alzheimer encontram-se múltiplas placas senis, que contêm um núcleo de substância amilóide predominantemente constituído pelo péptido β -amilóide, rodeado por células mortas. Segundo muitos investigadores, a deposição de β -amilóide no cérebro desencadeia a apoptose por activação de uma “caspase iniciadora”, conduzindo à lesão cerebral que está na origem dos sinais e sintomas da doença. Na doença de Parkinson, por outro lado, ocorre um

decréscimo progressivo do número de células que constituem uma estrutura nervosa designada por substância negra e que produzem dopamina. Estas células morrem naturalmente em todas as pessoas, mas terminam o seu ciclo de vida a um ritmo muito mais acelerado nos doentes parkinsonianos, manifestando-se a doença quando apenas restam 20% das células iniciais. Muitos investigadores constataram que a doença de Parkinson também está associada a elevados níveis de apoptose, onde o *stress* oxidativo e a mitocôndria parecem estar envolvidos. Esta doença pode, em alguns casos, ser hereditária ou pode, ainda, ser o resultado da acção tóxica de substâncias que existem no ambiente e que entram na composição de colas, tintas, petróleos, entre outros. Esta última convicção assenta na descoberta do xenobiótico MPTP, com uma estrutura semelhante ao “paraquat” presente nos herbicidas e pesticidas, o qual provoca, quer *in vitro* quer *in vivo*, morte celular por apoptose e sintomas semelhante aos da doença de Parkinson. Por último, na doença de Huntington ocorre uma perda progressiva de neurónios específicos na região do estriado, com correspondente decréscimo das capacidades motoras e cognitivas do indivíduo. Neste caso é a sequência expandida de poliglutamina presente na proteína huntingtina, sintetizada pelos doentes, que parece induzir alterações mitocondriais, *stress* oxidativo e apoptose, responsáveis pela patogénese da doença. A fragmentação do DNA também tem sido observada nas células do estriado destes doentes sugerindo, novamente, que os elevados níveis de apoptose poderão estar na origem da doença. Por outro lado, a administração a ratos de ácido 3-nitropropiónico provoca apoptose no estriado, induzindo alterações neuroquímicas e anatómicas características da doença de Huntington. Utilizando este modelo animal tem sido possível demonstrar o envolvimento da mitocôndria no processo apoptótico desencadeado na doença de Huntington.

Qual a estratégia a seguir para controlar níveis desajustados de apoptose?

Actualmente, existem vários estudos em curso na área da apoptose, cujo objectivo é a identificação de moléculas alvo sobre as quais se deverá actuar farmacologicamente, no sentido de impedir o processo de doença. Uma das ideias será a de utilizar os antagonistas dos receptores de morte, assim como os inibidores de capases, na expectativa de prevenir a apoptose em doenças inflamatórias ou destrutivas. Pela sua pequena toxicidade e pelas propriedades inibidoras da apoptose que apresenta, o ácido ursodesoxicólico a que acima nos referimos, poderá ser um meio terapêutico poderoso no tratamento de doenças hepáticas, neurodegenerativas ou outras, cuja patogénese esteja associada a elevados níveis de apoptose. Outra via de investigação diz respeito à potenciação da apoptose em células cancerosas, por recurso a ligandos dos receptores de morte, bem como a inibidores da expressão de proteínas anti-apoptóticas. Assim, este mecanismo de morte

celular, em primeira instância considerado “anti-natura”, poderá também ser utilizado pelo organismo para impedir o crescimento de células que se tornaram imortais.

Apoptose mediada pela via mitocondrial

A via mitocondrial envolve membros pro-apoptóticos da família Bcl-2 e, mais precisamente, elementos da sub-família BH₃ (Figura 1). Estas proteínas, que incluem a Bid, a Bim, a **Harakiri**, a Noxa, entre outras, possuem apenas um dos domínios de homologia (o BH₃) característicos da família Bcl-2. Em resposta a um estímulo, comprometem um outro conjunto de membros pro-apoptóticos, a sub-família da Bax, que inclui a Bax, a Bak e, provavelmente, a Bok, que normalmente se encontram fracamente associados à membrana externa da mitocôndria, prevalecendo maioritariamente no citosol. A interacção entre proteínas das sub-famílias BH₃ e Bax leva à oligomerização dos elementos do último grupo, seguida de inserção na membrana externa da mitocôndria. Estas moléculas passam, então, a constituir canais de saída de proteínas intermembranares desde a mitocôndria até ao citoplasma, incluindo o citocromo c e o factor indutor da apoptose. O citocromo c, uma vez libertado, activa uma proteína citoplasmática designada de Apaf-1, a qual recruta e activa a pro-caspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptossoma. A caspase-9, na sua função de “caspase iniciadora”, irá requerer e activar a caspase-3 “executora”, a qual degradará proteínas importantes para a viabilidade celular e, também, outras caspases.

As proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, bloqueiam a morte celular por prevenirem a libertação das proteínas intermembranares da mitocôndria. No entanto, uma vez ultrapassada a fase de morte celular que envolve este organito, as proteínas anti-apoptóticas deixam de ter qualquer efeito na inibição da apoptose. As proteínas pro-apoptóticas e as anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2, podem interagir entre si através dos domínios de homologia BH, formando homodímeros e regular, assim, reciprocamente, as suas funções. Por outro lado, a função das “caspases executoras” também pode ser modulada por um outro tipo de proteínas, as IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), que se podem ligar à caspase-9 e inibir a sua actividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico. Contudo, também a actividade destas proteínas pode ser regulada por uma outra proteína de nome duplo Smac/DIABLO, a qual, juntamente com o citocromo c, é libertada do espaço intermembranar da mitocôndria durante a apoptose. A Smac/DIABLO associa-se às IAPs e inibe a sua acção, permitindo a activação da caspase-9 a partir do complexo Apaf-1 e, consequentemente, favorecendo a apoptose.

Apoptose mediada pela via dos receptores de morte

Paralelamente à via mitocondrial, ocorre também a via dos receptores de morte, que vão desencadear a activação das caspases a partir de diferentes tipos de apoptossomas (Figura 1). Existem muitos receptores de morte, sendo os mais conhecidos, o receptor para o factor de necrose tumoral, o receptor para o ligando Fas/CD95 e, ainda, o receptor DR3. Esta via exige, sempre, que um determinado ligando interaja com o seu receptor através de proteínas adaptadoras, como por exemplo a proteína FADD (*Fas associated death domain*). Estas proteínas adaptadoras requerem a presença de pro-caspases, em particular a pro-caspases-8 e a pro-caspase-10, que quando clivadas activam as “caspases executoras”, podendo ocorrer a apoptose. Na via mediada pelos receptores de morte, a activação das caspases também pode ser inibida pelas IAPs.

Convergência das duas vias

Apesar da via dos receptores de morte não exigir o envolvimento da família de proteínas Bcl-2 ou da mitocôndria, alguns investigadores apontam para que a Bcl-2 possa inibir a apoptose desencadeada por receptores de morte. O mecanismo ligado à sinalização do receptor de morte e à via de inibição pela Bcl-2 surgiu com a descoberta da clivagem da proteína Bid pela caspase-8 a qual, por sua vez, é activada a partir dos receptores de morte. Neste mecanismo, a forma truncada de Bid (tBid), que constitui a sua forma activa, direcciona-se para a membrana mitocondrial externa, constituindo ela própria um poro e, simultaneamente, desencadeia a oligomerização de Bax, permitindo também a sua inserção na membrana externa da mitocôndria. A proteína Bax, tal como a Bid, pode formar um poro permeável a factores intermembranares. A via maioritária de apoptose irá, então, depender não só do tipo celular, como também do estímulo apoptótico, observando-se, muitas vezes simultaneamente, diferentes vias apoptóticas na mesma célula.

Bibliografia geral

- Beal MF. 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23, 298-304.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.
- Green DR. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102: 1-4.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-57.
- Mehmet H. 2000. Caspases find a new place to hide. *Nature* 403, 29-30.
- Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. 1998. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin. Liver Dis.* 18, 105-14.
- Rodrigues CMP, Steer CJ. 1999. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* 117, 732-6.
- Rodrigues CMP, Steer CJ. 2000. Mitochondrial membrane perturbations in cholestasis. *J. Hepatol.* 32, 135-41.

Bibliografia específica

- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* 20, 929-35.
- Rodrigues CMP, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. 1998. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, 2790-9.
- Rodrigues CMP, Linehan-Stieers C, Keene CD, Ma X, Kren BT, Low WC, Steer CJ. 2000. Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition. *J. Neurochem.* 75, 2368-79.
- Rodrigues CMP, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. 1999. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 6, 842-54.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-87.

Verhagen A, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.