

APOPTOSE: A IMPORTÂNCIA DA MAQUINARIA DE MORTE CELULAR NO CONTROLE E NA PATOGÊNESE DAS DOENÇAS

APOPTOSIS: THE IMPORTANCE OF CELL DEATH MACHINERY IN DISEASE CONTROL AND PATHOGENESIS

Carlos Kusano Bucalen FERRARI¹

RESUMO

Revisaram-se os principais eventos celulares e moleculares envolvidos na gênese da morte celular programada. Foram descritos os principais genes e proteínas reguladoras (Ceds, Caspases, CPP32, Bcl-x, Bad, Bax, V-abl, APC, Apaf-1, Ich-1), bem como o papel dos principais fatores do crescimento (NGF, IGF), hormônios, interleucinas e agentes agressores (xenobióticos, metais, neurotransmissores excitotóxicos, radicais livres do oxigênio, etc) sobre o desencadeamento dos programas de morte celular. As principais vias de estimulação ou inibição da apoptose foram relatadas. Diversas condições fisiopatológicas associadas ao aumento ou à diminuição das taxas teciduais de suicídio celular também foram descritas. O conhecimento das vias regulatórias da apoptose é fundamental para o controle e a prevenção de diversas doenças.

Unitermos: morte celular, doenças transmissíveis, doenças crônico-degenerativas, apoptose.

ABSTRACT

The main molecular and cellular events involved in the genesis of programmed cell death were reviewed. The major genes and its regulatory proteins (Ceds, Caspases, CPP32, Bcl-x, Bad, Bax, V-abl, APC, Apaf-1, Ich-1), as well as the role of some growth factors (NGF, IGF), hormones, interleucines, and injury agents (excitotoxic neurotransmitters, oxygen free radicals, xenobiotics, metals and particulate materials) on triggering off the cell death programs, were described. Besides, the main inhibiting or stimulating apoptotic pathways were related. Finally, a great number of physiopathological conditions associated with diminishing or increasing tissues cellular suicide rates were also described. So, the knowledge of apoptotic regulatory mechanisms is essential to the efficient control and prevention of many diseases.

Keywords: cell death, communicable diseases, chronic-degenerative diseases, apoptosis.

INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento embrionário e durante toda a vida, centenas ou milhares de células são perdidas e restituídas dia após dia. Assim, células

quiescentes, que já não se apresentam em pleno funcionamento, serão destruídas silenciosamente pelo organismo. Todavia, na presença de injúrias teciduais, quando os danos são irreversíveis, a célula perde sua magnitude vital.

⁽¹⁾ Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, 2º andar (HNT), 01246-904, São Paulo, SP., Brasil. Membro: da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, da Sociedade Brasileira de Biologia Celular; do "American Institute of Biological Sciences", New York Academy of Sciences, Society for Experimental Biology and Medicine.

Não há um único mecanismo ou via para que a célula perca sua vida. Em verdade, existem diversos tipos de necrose ou morte celular intensa e acidental e, possivelmente, diversos tipos de morte celular programada (MCP) ou apoptose^{52,59,64}. Assim, o objetivo deste trabalho é realizar uma breve revisão sobre a apoptose, um dos mais “apimentados” e promissores tópicos de pesquisa das Ciências da Vida na atualidade. Sua importância é tamanha, que surgiu até o periódico “apoptosis”, com pesquisas sobre os fenômenos de suicídio celular e métodos de pesquisa⁶¹.

O conceito de apoptose ou MCP foi primeiramente proposto em 1972 por Kerr *et al.*³⁰, embora o fenômeno tenha sido observado por Glücksmann em 1951 e Lockshin em 1974^{44,64}. O termo apoptose está relacionado ao fenômeno de auto-destruição celular observado no processo de queda das folhas das árvores durante o Outono. Assim, o termo grego *poptwsiz*, significa perda e renovação das folhas outonais^{30,52,60,64}. O processo apoptótico faz parte de uma série de estados fisiológicos ou patológicos dos organismos vivos, desde o desenvolvimento fetal, o controle da depleção de linfócitos T, a regressão de tumores, a renovação periódica (*turnover*) de linhagens de células normais, a perda de tecido neuronal ou cardíaco, e a perda de leucócitos induzida pela infecção do vírus da imunodeficiência humana (VIH), até a diferenciação final das células animais ou mesmo processos patológicos em células vegetais^{5,7,10,13,22,30,36,40,43,64}.

Ao contrário da necrose, em que há derramamento ou extravasamento de conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, na apoptose ocorre condensação citoplasmática, sem rompimento da membrana celular, e formação de corpos apoptóticos ou vesículas apoptóticas, que são prontamente reconhecidas e ingeridas por fagócitos locais, processos que impedem as reações inflamatórias nos tecidos adjacentes^{52,54,64}. Foi descoberto, recentemente, que o receptor celular CD14 tem um papel fundamental no reconhecimento e na fagocitose de corpos apoptóticos⁸. Além disso, a necrose-morte celular passiva – é provocada por uma injúria exaustiva sobre a célula, sendo caracterizada pelo extravasamento do conteúdo citoplasmático e de suas organelas, e por um padrão de distribuição da cromatina altamente floculado, que confere ao DNA uma aparência de mancha ou borrão na eletroforese em gel de agarose^{21,52}. Ao contrário, o DNA das células apoptóticas apresenta uma distribuição em bandas com intervalos

regulares^{52,53,60}. Diferenças entre a apoptose e a necrose e as características biomoleculares da MCP encontram-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Programação genética e expressão protéica na apoptose

Há diversos fatores envolvidos na ativação ou inibição da apoptose, mas, certamente, os genes apresentam um papel controlador especial. Muitos estudos têm sido realizados no verme *Caenorhabditis elegans*, que foi muito pesquisado e já teve seu genoma totalmente sequenciado pelo homem. Há pelo menos três genes que têm um papel indutor sobre o processo apoptótico: os genes morte celular-3 (ou *Cell Death-3 - Ced-3*), MC-4 (*Ced-4*) e MC-10 (*Ced-10*)^{13,57,64}. O produto da expressão do gene *Ced-3* é uma proteína homóloga às moléculas da família da enzima conversora da interleucina 1 β ou (*IL-1 β -converting enzyme*) (*ICE*), um conjunto de proteases apoptóticas ricas em cisteína, conhecidas como “caspases” (*cysteine-containing aspases*), que clivam peptídios em sítios contendo resíduos do aminoácido ácido aspártico. Dentre as caspases de células de mamíferos estão também incluídas a CPP32 e a Nedd-2/*Ich-1*^{26,57}. As enzimas *ICE/caspases* constituem um grupo de mediadores finais ou efetores dos eventos de MCP, que induzem a clivagem ou quebra das proteínas associadas ao controle do ciclo celular (ciclínas), à integridade da membrana nuclear (lamínas), ao reparo e integridade do DNA [*poly* (ADP-ribose) polymerase - *PARP*⁴, *DNA-PK*, *DFF*], e à organização dos microtúbulos e do citoesqueleto (*APC*, *fodrina*, *actina*, *MARK*)^{9,37,41,64}. Neste sentido, o uso de um inibidor específico das enzimas *ICE/Ced-3* - o tetrapeptídeo *Ac-YVAD-cmk* - foi capaz de bloquear a apoptose em células tumorais da linhagem *AK-5*¹. Além disso, as caspases ativam desoxirribonucleases, promovendo a degradação nuclear. Assim, Sakahira *et al.*⁵¹ revelaram que o mecanismo de ação da caspase-3 se dá através da inativação de um inibidor (*ICAD*) da desoxirribonuclease ativada por caspase (*caspase activating deoxyribonuclease - CAD*). Neste estudo, com a inibição do *ICAD* (massa molecular relativa de 32K), houve ativação da DNase (*CAD*), o que resultou em fragmentação nuclear. Ao contrário das enzimas *Ced-3*, o produto do gene *Ced-9*, que apresenta certa homologia com o proto-oncogene *bcl-2*, está envolvido na inibição da MCP através da supressão da ativação das caspases^{13,50,57}. Por outro lado, relatou-se que o gene

Ced-5 codifica uma proteína, similar à proteína humana DOCK180, que é responsável pelo rearranjo do citoesqueleto, possibilitando o reconhecimento e a fagocitose das células apoptóticas naquele verme⁶³. Acreditava-se que a proteína de 63-kD decodificada pelo gene Ced-4, não apresentasse qualquer homologia com outros polipeptídeos conhecidos⁵⁷. Todavia, uma proteína citoplasmática adaptadora, a APAF-1, capaz de ligar-se com o citocromo c liberado na injúria celular, induzindo a MCP²³, apresenta homologia com o peptídeo derivado do Ced-4 de *Caenorhabditis elegans*⁵⁷. Os

mais importantes genes responsáveis pelo suicídio celular em células humanas são representados pelo c-myc e p53^{12,13,60,68}, embora muitos outros devam estar envolvidos.

É sabido que os *oncogenes myc*, E1A, E2F e mesmo o ras são importantes controladores da proliferação celular, capazes de induzir a MCP. Quando há mutações nestes genes, a célula pode perder sua capacidade de cometer suicídio, o que pode resultar num acúmulo de células com material genético danificado, podendo ser formado um foco neoplásico¹².

Tabela 1. Características das células na morte celular programada e na necrose.

	Apoptose	Necrose
Estímulo	Fisiológico (relógio biológico, regulação genética ou patológico)	Patológico (injúria ou hostilidade)
Ocorrência	Individual; assíncrono e seletivamente	Grupal; degenerativo; lesão severa ou irreversível
Reversibilidade	Irreversível; após a ativação de endonucleases	Irreversível; depois da deposição de material floculento e amorfo na matriz mitocondrial
Ativação de endonucleases	Sim	Não
Morfologia celular	Enrugamento; projeções digitiformes da membrana celular; manutenção da integridade da membrana celular; e formação de corpos apoptóticos	Tumefação celular; perda da integridade da membrana celular e desintegração celular
Adesões entre células e membrana basal	Perda precoce	Perda tardia
Organelas	Tumefação tardia	Tumefação precoce
Liberação de enzimas lisossômicas	Não	Sim
Núcleo	Convolução e fragmentação da membrana nuclear	Desaparecimento (picnose, cariorrexia, cariólise)
Cromatina nuclear	Compactação em massas densas uniformes	Formação de grumos grosseiros e de limites imprecisos
Ativação de caspases	Geralmente	Não há
Controle genético	Sim	Não
Receptores de morte celular	Sim	Não há
Fagocitose	Presente, mesmo antes da lise	Ausente. Macrofagocitose após a lise
Inflamação exsudativa	Ausente. Não há liberação de compostos citoplasmáticos para o espaço extracelular	Presente. Induzida pelo conteúdo celular extravasado ao meio extracelular
Fragmentação do DNA	Internucleossômica em 1 ou 2h (máx. em 24h)	Aleatória
Padrão da eletroforese do DNA em gel de agarose	Fragmentação em bandas de 180-200 pb ou outras padronagens "em escada".	Padrão em esfregaço ou borrão, sem a formação de bandas.

Tabela 2. Características celulares e bioquímicas da apoptose.**Características da membrana citoplasmática**

Espessamento da membrana citoplasmática
 Perda das estruturas de especialização da membrana
 Perda de contatos célula-célula
 Formação de vesículas citoplasmáticas ou corpos apoptóticos
 Expressão/externalização de receptores de superfície contendo cisteína, como o FAS \Rightarrow Apo-1/Fas (CD95), *nerve growth factor receptor* (NGFR), *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) e outros (CD36)
 Exposição da fosfatidilserina ao meio externo
 Modificações na composição de carboidratos da superfície celular
 Ativação de sinais transdutores originários dos receptores de morte

Características citoplasmáticas

Condensação citoplasmática
 Compactação das organelas
 “Brotamento” do Retículo Endoplasmático
 Modificações membranosas \Leftrightarrow citosol \Leftrightarrow alterações do influxo iônico (Ca^{2+} , K^{+} e outros) mitocondrial
 Necessidade de ATP para novas sínteses protéicas (nem sempre)
 Ativação de transglutaminases dependentes de Ca^{2+} \Rightarrow ligações lisina-glutamil entre cadeias polipeptídicas \Rightarrow polimerização

Características nucleares

Condensação e marginação da cromatina nuclear
 Ativação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} - Mg^{2+} \Rightarrow fragmentação internucleossomal do DNA em bandas ou oligômeros de 50 e 180-200bp
 Ativação das pro-caspases \Rightarrow caspases \Rightarrow clivagem das proteínas citoplasmáticas e nucleares \Rightarrow perda da integridade estrutural

Por outro lado, o bcl-2, o v-abl, o gene *reaper* (cujo produto é um polipeptídeo de 65 aminoácidos) das células de *Drosophila melanogaster*, outros proto-oncogenes e certos genes virais (bacilovírus p35) podem impedir o processo apoptótico, aumentando a sobrevivência da célula^{22,57,58,64}. O proto-oncogene bcl-2, que pertence à família de proteínas Bcl-x, pode inibir a MCP induzida pela liberação do NF- κ B²⁵, além de sua atividade inibitória sobre as caspases. Seu produto de expressão é uma proteína de 26-kD. O bcl-2 também inibe o suicídio celular através da supressão da atividade da proteína Bax, cuja ação consiste em promover a ruptura da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, a liberação do citocromo c, evento que desencadeia a programação celular letal⁵⁰. Por fim, sabe-se que, quando fosforilada, a proteína *Bad* desliga-se da Bcl-x/Bcl-2, suprimindo a MCP; ao contrário, quando não há fosforilação, a *Bad* se liga à Bcl-x/Bcl-2, impedindo que estas estabilizem o citocromo c, o que resulta em apoptose^{19,46}.

Uma vez ocorrido algum estímulo que traga injúria à célula, são ativadas diversas vias de sinalização

celular, como a fosfatidil-inositol-3 quinase (PI-3K) que se liga à serina/treonina quinase (Akt/PBK), inibindo a MCP através da supressão da atividade das caspases^{31,41}. Também através da inibição da atividade da caspase-3 (CPP32/Yama), as proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*), como a hsp70, constituem supressores da MCP em situações de intenso estresse celular⁴².

Entretanto, outras vias de sinalização celular, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases* - MAPKS), geralmente atuam como promotoras da MCP (JNK, p38); embora outras (ERK), possam garantir a sobrevivência e proliferação celular^{7,31}.

As calpaínas, proteinases neutras ativadas pelo cálcio, produzidas na injúria isquêmica cerebral, são capazes de induzir a apoptose de neurônios. Os inibidores de calpaína (MDL28170, AK295 e *calpain inhibitor I*) são promissoras no controle da isquemia encefálica³¹. Porém, muitos outros fatores estão envolvidos na ativação ou supressão dos programas de apoptose.

Fatores que estimulam a morte celular programada

Como se sabe, boa parte da sinalização intercelular existe graças aos receptores da superfície celular. Então, a sobrevivência da célula dependerá, e muito, da interação entre os mais variados sinais externos (hormônios, drogas, nutrientes e outros fatores) e as diferentes moléculas de superfície. Várias estruturas de superfície celular, conhecidas como receptores de morte celular, têm sido envolvidos na indução da apoptose. Como receptores de morte celular, já foram descritos o FAS (APO/CD-95), presente em linfócitos, os receptores 1 e 2 para o fator de necrose tumoral (TNF-R1 e TNF-R2), o receptor de morte 3 (DR-3) e o grupo dos receptores ligadores apoptóticos relacionados com o fator de necrose tumoral (TRAIL1 a TRAIL4)¹⁴. O “sítio ativo” destas moléculas é uma seqüência de 60 a 80 aminoácidos, conhecido como domínio da morte. Embora ainda haja muita controvérsia a respeito das vias de ativação da MCP através dos receptores de morte, sabe-se que o FAS, forma um complexo com o FAD, ativando a proteína adaptadora FADD (*Fas-associated protein with death domain*). A caspase-8, ao se ligar com a FADD, forma o DISC, complexo sinalizador e indutor da morte (*death-inducing signaling complex*), resultando em eventos apoptóticos¹⁴. Recentemente, observou-se que o supressor tumoral p53 foi capaz de aumentar a expressão da molécula de superfície FAS/CD95 e de provocar a sua ligação com o FAD, formando o complexo FAS-FADD; perturbações estas que promoveram a mobilização de proteínas do Complexo de Golgi e terminaram por promover a MCP³.

Diversos mediadores da fisiologia celular, como as interleucinas 2 e 4 (IL-2 e IL-4), o fator de crescimento e transformação- β (*transforming growth factor*- β - TGF- β), o fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor- α - TNF- α), e a interferona- γ (interferon - INF- γ), normalmente induzem a MCP^{7,13,60,64}. Um dos mecanismos de indução da MCP ocorre através da produção das enzimas transglutaminases, responsáveis pela polimerização de proteínas. O TGF- β , o p53 (receptor de ácidos retinóicos e glicocorticóides), o ionóforo de cálcio e os ácidos retinóicos (trans- e 9-cis) são algumas moléculas capazes de induzir a expressão das transglutaminases, culminando, horas depois, nos fenômenos de MCP¹⁷.

Os Radicais Livres (RL) do oxigênio também constituem um conjunto importante de agentes indutores da MCP. O radical hidroxila (OH \cdot) promove a apoptose em neutrófilos polimorfonucleares, efeito parcialmente suprimido pela adição da enzima antioxidante catalase (CAT), mas não pela superóxido dismutase (SOD)⁴⁹. O

peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma espécie ativa do oxigênio (EAO), mas que não é radical livre, também é capaz de provocar a MCP^{5,21}. Do mesmo modo, outros radicais, como o superóxido (O₂ \cdot^-) e o peroxinitrito (ONOO \cdot^-) podem promover a MCP em diversas situações^{5,6,41,47,53}. Entretanto, os RL e EAO promovem a oxidação de lipídios das membranas e constituintes celulares, o que leva à fragmentação e liberação de produtos tóxicos (hidroperóxidos e aldeídos) capazes de provocar a apoptose de leucócitos infectados pelo VIH e de neurônios^{5,32}. Ressalta-se, ainda, que os RL oxidam as Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL), tornando-as tóxicas para a parede celular, o que pode resultar no desenvolvimento da aterosclerose. Neste sentido, sabe-se que as LDL oxidadas são capazes de induzir tanto a MCP quanto a necrose¹¹. Todavia, enfatiza-se que, quando ocorre de modo pouco intenso, o estresse oxidativo costuma estimular a proliferação celular, através de oncogenes como o RAS.

Sob a ação de diversos agentes lesivos, ocorre a hidrólise ou ruptura dos esfingolipídios da membrana celular, liberando as ceramidas, moléculas capazes de induzir tanto a proliferação quanto a morte celular, dependendo do tipo e da intensidade do agente indutor, bem como das inter-relações estabelecidas pelas células adjacentes^{24,28,40,52}. A este respeito, observou-se que a deficiência de colina induziu a apoptose em 27,4% das células PC12, após 72 horas. No mesmo trabalho, observou-se que concomitantemente à deficiência de colina houve diminuição nas concentrações de fosfatidilcolina (49%) e esfingomielina (34%). Ao contrário, as concentrações de ceramida e de diacilglicerol (DAG) aumentaram em 218 e 155%, respectivamente. Os pesquisadores ainda relataram que a adição de ceramida ao cultivo de células PC12 induziu a apoptose, o que não ocorreu com a adição de DAG⁶⁵.

A perda intracelular de K⁺ ou a mobilização citosólica de Ca²⁺, para o exterior ou interior, através de injúrias que tenham rompido o equilíbrio das membranas mitocondriais (liberação do citocromo c) e dos retículos endoplasmáticos, constituem outras formas pelas quais as células podem perder sua vitalidade via apoptose^{11,23,66}. O aumento do influxo de Ca²⁺, que ocorre concomitantemente com a diminuição da recaptura de Mg²⁺ do meio extracelular, através dos canais N-metil-D-aspartato (NMDA), resulta em liberação de glutamato e injúria neurológica⁶⁷.

No estresse oxidativo há liberação do cálcio para o exterior da mitocôndria, diminuindo o potencial de membrana. Para que o cálcio retorne ao interior da mitocôndria, é necessário que haja gasto de ATP, o que pode levar a célula à morte; efeito prevenido pela Bcl-2 e pelo antioxidante N-acetilcisteína⁴⁸.

Na infecção pelo VIH, a proteína viral gp120 é capaz de induzir a mobilização do Ca^{2+} intracelular, que ativa os receptores glutamatérgicos NMDA, resultando na superprodução de RL⁶² e na indução de proteínas quinases ativadas por mitógenos que estimulam proteases e endonucleases, induzindo a apoptose de células gliais e neurônios de camundongos⁶⁷. Na ativação de fagócitos, ocorre hiperpolarização da membrana citoplasmática, com intenso estresse oxidativo, levando as células ao suicídio, efeito que foi inibido pela adição de SOD, mas não de CAT²⁰.

Diversas injúrias celulares externas, provocadas por metais contaminantes (Cádmio), material particulado (sílica), fontes radioativas (raios X, radiações gama e UV), hipertermia ou hipotermia são capazes de induzir a MCP^{16,24,27,35,47,58,60}. Até nas relações entre os parasitas tripanosomatídeos (*Trypanosoma sp* e *Leishmania sp*) e seus hospedeiros invertebrados (hemípteros e flebotomíneos, respectivamente) e vertebrados (homem) estabelecem-se alguns processos de apoptose, evitando-se certas reações inflamatórias indesejáveis, o que confere subsídios ainda maiores à teoria co-evolutiva do parasitismo², uma vez que o objetivo do parasita não é provocar lesões graves ou morte em seu hospedeiro, mas apenas obter deste os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento^{18,34}.

Inibindo a apoptose e garantindo a sobrevivência da célula

Um conjunto importante de moléculas que garantem a sobrevivência da célula é representado pelas integrinas que conectam o citoesqueleto à matriz extracelular. Certos agentes como o zinco ou o ácido aurintricarboxílico são capazes de inibir a ativação de endonucleases, bloqueando a apoptose³¹.

A programação da morte celular também pode ser suprimida pela atividade da IL-1 α , do fator de crescimento de insulina-1 (*insulin growth factor-1* - IGF-1), do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF), do fator de crescimento neural (*nerve growth factor* - NGF), de substâncias que apresentam efeito antioxidante, como os grupamentos thióis (enzimas glutationas), com selênio (ebsellem), zinco e cobre (Glutationa peroxidase), e outros antioxidantes^{6,7,10,39,40,53,60,64}.

O deprenil, inibidor da monoamino-oxidase (iMAO), induz a síntese de uma proteína derivada do gene Bcl-Xl, a proteína l induzida pelo deprenil (DIP-1), que inibe a MCP de neurônios³¹. A Tabela 3 agrupa alguns fatores que ativam ou suprimem a MCP.

Tabela 3. Fatores reguladores da apoptose e situações correlatas.

Agentes indutores da apoptose	Agentes supressores da apoptose
Metais e outros agentes químicos	Promotores tumorais (fenobarbital e hexaclorociclohexano)
Peptídeo β -amilóide (Alzheimer)	Inibidores de protease que clivam a cisteína
Drogas quimioterapêuticas	Inibidores de calpaína
Radiação (UV e gama)	Genes virais [Herpesvírus (γ 1345), Vírus Epstein-Barr (BHRF-1,LMP-1), Cowpox (crmA), Baculovirus (IAP, p35), Vírus da febre suína africana (LMW5-HL) e Adenovírus (E1B)]
Frio e calor	Androgênios e Estrogênios
Material particulado (asbesto e sílica)	Zinco
Proteína gp120 do VIH	Aminoácidos neutros
Toxinas bacterianas	Matrix extracelular
Oncogenes (myc, rel, E1A, E2F, Ras)	Fatores de crescimento
Supressores tumorais (P53)	Ligador do receptor CD40
Deprivação de nutrientes	Antioxidantes celulares (Zinco, cobre, Superóxido Dismutase, Catalase, Glutationa peroxidase)
Células T citotóxicas (granzima B)	Antioxidantes dietéticos (Selênio-ebsellem, compostos com grupos thióis, ácido ascórbico, α -tocoferol, N-acetil-cisteína, trolox, L-cisteína)
Fator de Necrose Tumoral – TNF	
TGF- β	
Neurotransmissores excitotóxicos em diversas doenças neurodegenerativas (dopamina, glutamato e NMDA)	
Glicocorticóides (estresse)	
Elevação do Cálcio intracelular (doenças neurodegenerativas, estresse oxidativo, cardiopatias isquêmica e aterosclerótica)	
Oxidantes/radicais livres (vários)	

Quando a apoptose está relacionada a estados fisiopatológicos?

Diversos estados fisiopatológicos, desde infecções até doenças degenerativas, estão associados à ocorrência da apoptose. Na fisiopatologia da aterosclerose há a oxidação do colesterol do tipo lipoproteína de baixa densidade (LDL), originando a citotoxina LDL-ox⁵⁶, capaz de induzir a morte celular apoptótica ou necrótica¹¹. Ressalta-se que o colesterol encontrado em alimentos de origem animal também sofre oxidação, formando óxidos igualmente citotóxicos e aterogênicos^{16,33}. Ainda em relação às doenças cardíacas, têm sido relatada a presença de fenômenos apoptóticos em pacientes com insuficiência cardíaca⁴³. Outro exemplo de elevada taxa apoptótica se refere à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, em que, além da depleção de linfócitos e outros leucócitos, ocorre a perda de neurônios, fenômenos que estão associados ao aumento da gravidade da doença^{5,62}. Neste sentido, já existem fortes indícios de que a apoptose é um fenômeno ativo nas infecções, uma vez que o organismo promove a morte celular para eliminar as células infectadas ou parasitadas⁶⁴, assim como o faz com certas células transformadas ou neoplásicas^{29,44,55}.

Entretanto, em diversas injúrias, fatores fisiológicos protegem as células da MCP. Este é o caso do efeito protetor do fator de crescimento neural (*Nerve Growth Factor* - NGF) sobre as células retinianas lesadas³⁶. Também é o caso dos antioxidantes, que previnem a formação de radicais livres do oxigênio, evitando a morte celular (apoptótica ou necrótica)^{6,10}. Porém, nem sempre a inibição da apoptose apresenta aspectos positivos ao organismo, como é o caso da acumulação inapropriada de células cancerígenas. No intestino, por exemplo, deve haver um adequado balanço entre proliferação e perda de células, caso contrário estarão criadas as condições favoráveis para o aparecimento de neoplasias malignas, certamente influenciadas por substâncias tóxicas presentes na dieta³⁸.

Efeitos benéficos da apoptose

Assim como os oncogenes, que representam um papel importante no controle da proliferação celular, diversos outros fatores indutores da apoptose podem controlar ou mesmo tratar doenças.

Sabe-se que a restrição dietética aumentou em mais de 50% a taxa de apoptose e diminuiu a taxa de proliferação de hepatócitos em camundongos²⁹. Também foi observada menor incidência de hepatomas em camundongos com dieta restrita em relação ao grupo *ad libitum*²⁹. Na mesma direção, Schulte-Hermann *et al.*⁵⁵ observaram que a restrição alimentar aumentou as taxas

de MCP de modo a propiciar uma diminuição de 85% nos focos de células pré-neoplásicas. O gene APC, que induz a apoptose, controlando a população de células epiteliais, evita a supra-proliferação celular ou neoplásica³⁸.

Diversos antioxidantes apresentam efeitos inibitórios sobre o processo apoptótico. Entretanto, certos produtos anticancerígenos naturais (extratos de maçã, alho e vegetais crucíferos), às vezes tidos como antioxidantes (embora haja certa controvérsia) são capazes de promover MCP, defendendo o organismo de células neoplásicas⁷. Também é o caso de certas drogas anti-tumorais, como as quinonas, indutoras do estresse oxidativo e da morte programada de células transformadas⁴⁵. Recentemente, descreveu-se que a ativação da MCP é importante para eliminar, ao menos em parte, as células inflamatórias do líquido sinovial em casos de artrite reumatóide, o que pode ser benéfico no controle da doença²⁸.

Diversas possibilidades terapêuticas tanto para induzir a MCP, quando para inibi-la foram bem descritas por Thompson⁵⁸ e Kinloch *et al.*³¹. Assim, a Tabela 4, agrupa diversas doenças relacionadas à elevada perda ou à baixa perda (baixa renovação) celular apoptótica.

Como detectar a morte celular programada?

Em laboratórios mais simples, podem ser realizados exames de microscopia óptica para a detecção das seguintes características morfológicas: condensação e marginação da cromatina nuclear, enrugamento celular e manutenção estrutural da membrana citoplasmática^{11,22}. Utiliza-se coloração de *May-Giemsa-Grunwald* para a microscopia de luz^{11,49} e a de fluorescência (com brometo de etídio ou iodeto de propídio) para a análise da fragmentação nuclear^{11,47}. Ademais, ao contrário das necróticas, as células apoptóticas não são coradas pelo azul tripan¹¹. Também podem ser utilizadas as microscopias eletrônica de transmissão⁴⁷ e confocal⁴³.

A principal característica diferencial da apoptose (em relação a necrose) é a fragmentação do DNA, que origina oligômeros ou bandas de 50 e 180-200 pares de bases, claramente observados através da eletroforese em gel de agarose^{20,53}, em que se utilizam corantes fluorescentes^{11,15,47}. Testes para detectar a clivagem do DNA [o método TUNEL em que mede-se a ligação específica da *desoxinucleotidil-transferase* (TdT) às terminações 3-OH do DNA]^{7,39,43}, das laminas (clivagem da lâmina A que passa de 70kDa para 52kDa) e da PARP (de 115kDa para 85kDa)¹, também são muito utilizados. O método TUNEL vem sendo utilizado até para verificar a presença de células apoptóticas em cortes histopatológicos²⁸.

Tabela 4. Doenças associadas à diminuição ou à elevação das taxas de morte celular programada.

Patologias relacionadas à diminuição da MCP	Patologias relacionadas à elevação da MCP
Infecções virais (adenovírus, herpesvírus e poxvírus)	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (deleção de linfócitos, leucócitos e apoptose neuronal)
Doenças auto-imunes (Lupus Eritematoso Sistêmico, glomerulonefrite, síndrome hipereosinofílica, doença de Graves e artrite reumatóide)	Colite ulcerativa
Síndrome linfoproliferativa auto-imune (Síndrome de Canale-Smith)	<i>Diabetes mellitus</i>
Linfomas foliculares	Tireoidite de Hashimoto
Leucemia	Falência hepática
Carcinomas com mutações no gene P53	Síndromes mielodisplásticas
Tumores hormônio-dependentes (mama, ovário e próstata)	Anemia aplástica
	Neutropenia crônica do tipo I
	Cânceres (melanoma, hepatoma e câncer de cólon)
	Infarto do miocárdio
	Injúria por reperfusão
	Intoxicação por etanol
	Doenças neurodegenerativas (Parkinson, degeneração cerebelar, Alzheimer, retinite pigmentosa e esclerose lateral amiotrófica)
	Osteoporose

CONCLUSÃO

A apoptose apresenta enorme relevância desde o período embrionário até o envelhecimento humano, sendo importante para garantir o controle da proliferação celular não apenas em nossa espécie, mas também em diversos seres vivos. A compreensão dos principais indutores ou inibidores internos e externos dos programas de morte celular é de fundamental relevância para o avanço da medicina e das ciências da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos revisores, pelo trabalho de ler e corrigir este extenso manuscrito. Ao CNPq pela bolsa de estudos de Doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJUM, R., KHAR, A. Caspase-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells: a cell-free study using peptide inhibitors and antisense strategy. *Exp Cell Res*, San Diego, v.236, n.1, p.371-377, 1997.
2. BARCINSKI, M. Apoptosis in Trypanosomatids: evolutionary and Phylogenetic considerations. *Genet Mol Biol*, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.21-24, 1998.
3. BENNETT, M. *et al.* Cell surface trafficking of FAS: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, Washington DC, v.282, n.5387, p.290-293, 1998.
4. BERNARDI, R. *et al.* Activation of poy (ADP-ribose) polymerase in apoptotic human cells. *Biochimie*, Paris, v.77, n.5, 378-384, 1995.
5. BUTTKE, T.M., SANDSTROM, P.A. Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. *Free Rad Res*, London, v.22, n.5, p.389-397, 1995.
6. CLUTTON, S. The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull*, London, v.53, n.3, p.662-668, 1997.
7. DELONG, M. Apoptosis: a modulation of cellular homeostasis and disease states. *Ann NY Acad Sci*, New York, v.842, p.82-90, 1998.
8. DEVITT, A. *et al.* Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, London, v.392, n.6675, p.505-509, 1998.
9. DREWES, G. *et al.* MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, Cambridge, v.89, n.3, p.297-308, 1997.
10. DRUKARCH, B. *et al.* Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med*, New York, v.25, n.2, p.217-220, 1998.
11. ESCARGUEIL-BLANC, I., SALVAYRE, R., NÉGRE-SALVAYRE, A. Necrosis and apoptosis induced

- by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J*, Bethesda, v.8, n.13, p.1075-1080, 1994.
12. EVAN, G., LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. *Science*, Washington DC, v.281, n.5381, p.1317-1321, 1998.
 13. FANIDI, A., EVAN, G. Applications of apoptosis: making death pay. *Trend Biotechnol*, Amsterdam, v.12, n.6, p.219-221, 1994.
 14. FAUBION, W.A., GORES, G.J. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology*, Orlando, v.29, n.1, p.1-4, 1999.
 15. FERLINI, C. *et al.* Sequence of metabolic changes during X-Ray-induced apoptosis. *Exper Cell Res*, San Diego, v.247, n.1, p.160-167, 1999.
 16. FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações patológicas e nutricionais. *Rev Nutr*, Campinas, v.11, n.1, p.3-14, 1998.
 17. FESUS, L. *et al.* Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, Basel, v.52, n.11, p.942-948, 1996.
 18. FORATTINI, O.P. Interações e comportamento – parasitismo. In: ECOLOGIA, epidemiologia e sociedade. São Paulo : Artes Médicas, 1992. p.125-133.
 19. FRANK, T.F., CANTLEY, L.C. A Bad kinase makes good. *Nature*, London, 390, n.6656, p.116-117, 1997.
 20. GAMALEY, I.A., KIRPICHNIKOVA, K.M., KLYUBIN, I.V. Superoxide release is involved in membrane potential changes in mouse peritoneal macrophages. *Free Rad Biol Med*, New York, v.24, n.1, p.168-174, 1998.
 21. GARDNER, A.M. *et al.* Apoptotic VS nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med*, New York, v.22, n.1-2, p.73-83, 1997.
 22. GILCHRIST, D.G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Ann Rev Phytophatol*, Palo Alto, v.36, p.393-414, 1998.
 23. GREEN, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, Cambridge, v.94, n.6, p.695-698, 1998.
 24. HANNUN, Y.A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, Washington DC, v.274, n.5294, p.1855-1859, 1996.
 25. HERRMANN, J.L. *et al.* Bcl-2 supresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kB survival pathway. *Exp Cell Res*, San Diego, v.237, n.1, p.101-109, 1997.
 26. HIGUCHI, M., AGGARWAL, B.B., YEH, E.T.H. Activation of CPP32-like protease in Tumor Necrosis Factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest*, Ann Arbor, v.99, n.7, p.1751-1758, 1997.
 27. HOMMA-TAKEDA, S., ISHIDO, M., TOHYAMA, C. Cadmium-induced apoptosis causes in the proximal tubules of rat kidney. *J Occup Health*, Tokyo, v.39, n.4, p.242-243, 1997.
 28. ICHINOSE, Y. *et al.* Apoptosis induction in synovial fibroblasts by ceramide: in vitro and in vivo effects. *J Lab Clin Med*, St. Louis, v.131, n.5, p.410-418, 1998.
 29. JAMES, S.J. *et al.* Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implications for carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, Research Triangle Park NC, v.106, Supplement 1, p.307S-312S, 1998.
 30. KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.H. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, London, v.26, n.2, p.239-257, 1972.
 31. KINLOCH, R.A. *et al.* The pharmacology of apoptosis. *Trend Pharmacol Sci*, Amsterdam, v.20, n.1, p.35-42, 1999.
 32. KRUMAN, I. *et al.* Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*, San Francisco, v.17, n.13, p.5089-5100, 1997.
 33. KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products. *Free Rad Biol Med*, New York, v.12, n.1, p.63-81, 1992.
 34. LEDERBERG, J. Infectious disease as an evolutionary paradigm. *Emerg Infect Dis*, Atlanta, v.3, n.4, p.417-423, 1997.
 35. LEIGH, J. *et al.* Silica-induced apoptosis in aveolar and granulomatous cells in vivo. *Environm Health Perspect*, Research Triangle Park, NC, v.105, n.12, p.1241-1245, 1997.
 36. LINDEN, R., CHIARINI, L.B. Nuclear exclusion of transcription factors associated with apoptosis in developing nervous tissue. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v.32, n.7, p.813-820, 1999.
 37. LIU, X. *et al.* A heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA

- fragmentation during apoptosis. *Cell*, Cambridge, v.89, n.2, p.175-184, 1997.
38. MATHERS, J.C. Nutrient regulation of intestinal proliferation and apoptosis. *Proc Nutr Soc*, London, v.57, n.2, p.219-223, 1998.
 39. MAULIK, N., YOSHIDA, T., DAS, D.K. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Rad Biol Med*, New York, v.24, n.5, p.869-875, 1998.
 40. MCCONKEY, D.J., ORRENIUS, S. Signal transduction pathways to apoptosis. *Trend Cell Biol*, Amsterdam, v.4, n.10, p.370-375, 1994.
 41. MEBMER, V.K., BRÜNE, B. Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content, and p53 accumulation. *Arch Biochem Biophys*, Orlando, v.327, n.1, p.1-10, 1996.
 42. MOSSER, D.D. *et al.* Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, Bethesda, v.17, n.9, p.5317-5327, 1997.
 43. OLIVETTI, G. *et al.* Apoptosis in the failing human heart. *New Engl J Med*, Boston, v.336, n.16, p.1131-1141, 1997.
 44. PETER, M., HEUFELDER, A.E., HENGARTNER, M.O. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci*, Washington DC, v.94, n.24, p.12736-12737, 1997.
 45. QIU, X-B., SCHÖNTHAL, A.H., CADENAS, E. Anticancer quinones induce pRb-preventable G₂/M cell cycle arrest and apoptosis. *Free Rad Biol Med*, New York, v.24, n.5, p.848-854, 1998.
 46. RAFF, M. Cell suicide for beginners. *Nature*, London, v.396, n.6707, p.119-122, 1998.
 47. RAUEN, U. *et al.* Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *Faseb J*, Bethesda, v.13, n.1, p.155-168, 1999.
 48. RICHTER, C. *et al.* Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*, Amsterdam, v.378, n.2, p.107-110, 1996.
 49. ROLLET-LABELLE, E. *et al.* Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Rad Biol Med*, New York, v.24, n.4, p.563-572, 1998.
 50. ROSSÉ, T. *et al.* Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, London, v.391, n.6666, p.496-499, 1998.
 51. SAKAHIRA, H., ENARI, M., NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, London, v.391, n.6662, p.96-99, 1998.
 52. SAMALI, A., GORMAN, A.M., COTTER, T.G. Apoptosis: the story so far. *Experientia*, Basel, v.52, n.9, p.933-941, 1996.
 53. SANDOVAL, M. *et al.* Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. *Free Rad Biol Med*, New York, v.22, n.3, p.489-495, 1997.
 54. SAVILL, J. Apoptosis: phagocytic docking without shocking. *Nature*, London, v.392, n.6675, p.442-443, 1998.
 55. SCHULTE-HERMANN, R. *et al.* Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett*, Amsterdam, v.82/83, n.1, p.143-148, 1995.
 56. STEINBERG, D. *et al.* Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med*, Boston, v.320, n.14, p.915-924, 1989.
 57. STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, Washington DC, v.267, n.5203, p.1445-1449, 1995.
 58. THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, Washington DC, v.267, n.5203, p.1456-1462, 1995.
 59. THOMPSON, E.B. Special topic: apoptosis. *Ann Rev Physiol*, Palo Alto, v.60, p.525-532, 1998.
 60. VASCONCELOS, A.C., MORO, L., SILVA, P.M. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia veterinária. *Rev Port Ciênc Veter*, Lisboa, v.95, p.182-193, 1996.
 61. VIDAL, B.C. *et al.* Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. *Apoptosis*, New York, v.1, n.3, p.218-221, 1996.
 62. VINCENT, J-D. *et al.* Étude expérimentale des mécanismes de la mort neuronale au cours de l'infection à VIH. *Bull Acad Natle Méd*, Paris, v.181, n.4, p.713-724, 1997.
 63. WU, Y-C., HORVITZ, H.R. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK 180. *Nature*, London, v.392, n.6675, p.501-504, 1998.

64. WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*, London, v.53, n.4, p. 451-465, 1997.
65. YEN, C-L.E., MAR, M-H., ZEISEL, S.H. Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase. *Faseb J*, Bethesda, v.13, n.2, p.135-142, 1999.
66. YU, S.P. *et al.* Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science*, Washington DC, v.278, n.5335, p.114-117, 1997.
67. ZHANG, L. *et al.* Reduction of voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA current in mechanically injured neurons. *Science*, Washington DC, v.274, n.5294, p.1921-1923, 1996.
68. ZYCHLINSKY, A., SANSONETTI, P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest*, Ann Arbor, v.100, n.3, p.493-495, 1997.

**Recebido para publicação em 7 de dezembro de 1999 e
aceito em 30 de junho de 2000.**